

چکیده:

سابقه و هدف: عفونت ها از مهمترین علل مرگ در بخش های مراقبت ویژه (ICU) می باشد. شیوع اشريشياکلی های مولد بتالاکتامازهای با طیف گسترده (ESBLs) از مشکلات مهم ICU می باشد. هدف از این بررسی تعیین فراوانی ESBLs و فراوانی ژن های bla_{TEM} , $bla_{CTX-M-I}$ و bla_{SHV} در سویه های بالینی اشريشياکلی جدا شده از ICU بود.

روش مطالعه: ۲۱۰ ایزوله یوروپاتوژن اشريشياکلی از بیماران بستری در ICU بیمارستان های قزوین، کرج و تهران جمع آوری گردید. ایزوله ها با روش فنو تیپی از نظر حضور ESBLs غربالگری و با روش دیسک ترکیبی بر روی محیط مولر هینتون آگار فاقد و دارای کلوگراسیلین انجام گرفت و با استفاده از آزمون PCR و تعیین توالی فراوانی ژن های bla_{SHV} , bla_{TEM} و $bla_{CTX-M-I}$ مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: از ۲۱۰ ایزوله یوروپاتوژن اشريشياکلی، ۱۶۱ (۷۶/۷٪) ایزوله مولد ESBLs می باشند. نتایج تست های تاییدی نشان داد که ۲/۵٪ از ایزوله ها تنها با روش دیسک ترکیبی بر روی محیط حاوی کلوگراسیلین مثبت شدند. ایزوله های مولد ESBLs دارای مقاومت بسیار بالا نسبت سفالوسپورین ها و مونوباکتام ها می باشند (۱۰۰٪ - ۶۵/۲٪)، ۶۸/۳٪ از ایزوله ها به ایمپنم و ۲۸٪ از ایزوله ها به سفوکسیتین مقاوم بودند. نتایج حاصل از PCR نشان داد که فراوان ترین ژنوتیپ $bla_{CTX-M-I}$ (۵۳/۴٪) و پس از آن ژن bla_{TEM-I} (۱۶/۸٪) تعیین گردید. ده درصد از این ایزوله ها هر دو ژن $bla_{CTX-M-I}$ و bla_{TEM} را به طور هم زمان دارا بودند. ژن bla_{SHV} در هیچ یک از ایزوله ها شناسایی نشد. نتایج تعیین توالی نشان داد، ایزوله های مولد $bla_{CTX-M-I}$ از نوع (۹۶/۵٪ $bla_{CTX-M-15}$ و ۳/۵٪ $bla_{CTX-M-12}$ به عنوان اولین گزارش از ایران) می باشند. نتایج مطالعه حاکی از شیوع بالای مقاومت و تولید ESBLs در بین اشريشياکلی های یوروپاتوژن بخش ICU می باشد.

واژگان کلیدی: اشريشياکلی، یوروپاتوژن، بتالاکتاماز طیف گسترده (ESBLs)، ICU.

۱-۱ معرفی و بیان مسئله :

عفونت های بیمارستانی یکی از مشکلات مهم و اساسی مراکز بیمارستانی می باشد که سبب افزایش موربیدیتی و مورتالیتی و همچنین افزایش هزینه های درمانی می گردد. عفونت های بیمارستانی به دلیل مرگ و میر بالا و افزایش هزینه های درمانی یکی از مهمترین چالش های است که بخش مراقبت های ویژه (ICU)^۱ با آن مواجه است. نرخ عفونت بیمارستانی در بخش مراقبت های ویژه در مقایسه با بخش های دیگر بیمارستان بالا است و شیوع آن در ICU بیشتر از سایر بخش های بیمارستان می باشد. بیماران بستری در ICU در معرض خطر بیشتری برای ابتلای به عفونت های بیمارستانی می باشند، به طوریکه تقریباً ۲۵٪ عفونت های بیمارستانی و ۹۰٪ طغیان ها در بخش های مراقبت ویژه بیمارستان ها رخ می دهد. لذا بخش های مراقبت ویژه از قسمت های خطر بیمارستان می باشند و بیمارانی که در این بخش ها بستری می شوند دامنه وسیعی از اختلالات عملکردی و یا نقص در یک یا چند ارگان به ویژه سیستم های تنفسی و قلبی و عروقی دارند. از آنجایی که مداخلات تهاجمی و استفاده از کاتتر های وریدی و ادراری و دستگاه های کمک تنفسی به طور وسیع به کار گرفته می شود، خطر ابتلا به عفونت ها افزایش می یابد. این بخش ها به عنوان مخازن باکتری های ویرولان و اغلب فوق العاده مقاوم می باشند که اغلب از طریق دست پرسنل و یا وسایل پزشکی به سهولت بین بیماران انتشار می یابند. از سوی دیگر مصرف بی رویه عوامل ضد میکروبی به کلونیزه شدن میکرو ارگانیسم های مقاوم منجر می گردد. باسیل های گرم منفی با مقاومت چند گانه از پاتوژن های مهم بخش های ICU می باشند که سبب نرخ بالای مرگ و میر در بیماران بستری در این بخش ها می گردد. در این میان، اشریشیاکلی^۲ به عنوان یکی از اعضای خانواده انتروباکتریاسه که از گروه باسیل های گرم منفی بی هوازی اختیاری می باشند، از عوامل مهم ایجاد کننده

^۱ Intensive Care Units
^۲ *Escherichia coli* (*E.coli*)

عفونت بیمارستانی در ICU به شمار می رود. این ارگانیزم شایعترین علت ایجاد عفونت های مجاری ادراری و همچنین یک پاتوژن مهم در مننژیت نوزادان و عفونت های تنفسی و سپسیس در بیماران بستری در بخش های مختلف بیمارستان بویژه بخش مراقبت های ویژه می باشند. مقاومت انتی بیوتیکی در بین سویه های *E.coli* بسیار شایع است و این به سبب کسب فاکتورهای مقاومت متعدد می باشد [۴-۱]. در طی سال های اخیر ظاهر شدن سویه های با الگوی مقاومت دارویی چند گانه (MDR)^۳ و سویه های مقاوم به سفالوسپورین های نسل سوم، درمان بیماران الوده به این ارگانیزم ها را مشکل تر و پیچیده تر ساخته است [۱۱-۱]. لذا با توجه به اهمیت مقاومت به سفالوسپورین های با طیف اثر گسترده و آنتی بیوتیک های بتا لاکتام که در درمان عفونت های ناشی از باسیل های گرم منفی در بیماران بستری در بخش های ICU فراوانی دارد و با توجه شیوع بالای سویه های مولد آنزیم های بتالاکتاماز با طیف گسترده در *E.coli* و اطلاعات اندک در خصوص آنزیم های بتالاکتاماز با طیف گسترده ESBLs^۴ به ویژه CTX-M در ایران، بر آن شدیم که مطالعه ای در خصوص فراوانی ESBLs و با استفاده از روش های فنوتیپی استاندارد و فراوانی ژن های مولد آنها *bla*_{CTX-M-I} , *bla*_{TEM} و *bla*_{SHV} در سویه های *E.coli* ایزوله شده از بیماران بستری در بخش های مراقبت های ویژه در بیمارستان های تهران، قزوین و کرج انجام دهیم.

۱-۲ خانواده انتروباکتریاسه^۵

این خانواده بزرگترین و ناهمگون ترین مجموعه باسیل های گرم منفی هستند که از لحاظ بالینی اهمیت دارند و در مجموع ۴۸ جنس^۶ و بیش از ۱۳۰ گونه^۷ از این خانواده توصیف شده اند (طبقه بندی کامل

^۳ Multi Drug Resistant
^۴ Extended Spectrum Beta Lactamases
^۵ Enterobacteriaceae
^۶ Genera
^۷ Species

جنس و گونه و زیر گونه های شناسایی شده در سایت www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser ارائه شده است) [۸-۹]. جنس های این خانواده بر اساس خصوصیات بیوشیمیایی، ساختار آنتی ژنیک و ترادف یابی اسیدهای نوکلئیک طبقه بندی شده اند. این باکتری ها باعث ایجاد بیماری های مختلفی در انسان می شوند. برخی از ارگانیزم ها مانند سالمونلا^۸ و گونه های شیگلا^۹ همیشه مرتبط با بیماری هستند ولی برخی دیگر مانند اشریشیا کلی^{۱۰}، کلبسیلا^{۱۱} پروتئوس^{۱۲} و ... به عنوان فلور طبیعی روده بوده و با فراهم شدن شرایطی مانند کسب ژن های بیماری زا از طریق پلاسمید و باکتریوفاژ، به هم خوردگی فلور میکروبی، جابه جایی فلور میکروبی، تغییر جایگاه و ... قدرت بیماری زایی را به دست آورده و سبب ایجاد عفونت های فرصت طلب می شوند [۱۱].

انتروباکتریاسه ها هوازی یا بی هوازی اختیاری هستند و طیف وسیعی از کربوهیدرات ها را تخمیر می کنند. این باکتری ها ساختار آنتی ژنی پیچیده ای داشته، سموم و عوامل بیماری زای زیادی تولید می کنند. این خانواده شایع ترین گروه باسیل های گرم منفی هستند که در آزمایشگاه های بالینی کشت داده می شوند و در میان شایع ترین باکتری های ایجاد کننده بیماری در کنار استافیلوکوک^{۱۳} و استرپتوکوک ها^{۱۴} قرار دارند. این باکتری ها در تمامی محیط های مقوی قابلیت رشد داشته و بسته به توانایی متابولیسم خود و بر حسب محتویات محیط کشت، کلونی های منحصر به فردی ایجاد می نمایند. تعدادی از آنها که به طور کلاسیک بیماری زا هستند، هنگامیکه از نمونه های بالینی جدا می گردند، بدون توجه به تعداد کلونی ایجاد شده به عنوان عامل بیماری منظور می گردند مانند: سالمونلا، شیگلا و یرسینیا^{۱۵} بعضی از دیگر از اعضای خانواده انتروباکتریاسه همانند باکتری هایی که در ناحیه گوارشی به شکل کومنسال قرار دارند.

Salmonella spp.^۸
 Shigella spp.^۹
 Escherichia coli^{۱۰}
 Klebsiella^{۱۱}
 Proteus^{۱۲}
 Staphylococcus^{۱۳}
 Streptococcus^{۱۴}
 Yersinia^{۱۵}

بدون ایجاد علائم بیماری در انسان مستقر می گردند. اعضای این گروه می توانند مولد بیماری های عفونی در نواحی مختلف بدن مانند خون، مایع نخاع، ناحیه تنفسی، دستگاه گوارشی، دستگاه ادراری، بافت های نرم، مایعات استریل بدن و در نواحی مختلف بیماران با نقص سیستم ایمنی باشند. این ارگانیسم ها اگر در مناطق حساس بدن مانند حفره ی شکمی، ریه، فرد مبتلا به نقص ایمنی و مایع نخاع مستقر گردند می توانند ایجاد بیماری نمایند. سایر گونه ها نیز بسته به فاکتور های ویروالانس همراه با سندروم های خاص دیده می شوند[۶].

۱-۳ تاریخچه:

اشریشیاکلی اولین بار توسط پزشک آلمانی به نام تئودور اشریش^{۱۶} در طی مطالعاتش بر روی فلور نرمال روده اطفال، شناسایی شد. او در سال ۱۸۸۵ ارگانیسم را به عنوان باکتریوم کلی کامیون^{۱۷} معرفی کرد و در سال ۱۸۹۴ ویژگی های پاتوژنیک باکتری را در عفونت های خارج روده ای پایه گذاری کرد. نام باکتریوم کلی تا سال ۱۹۱۹ به صورت گسترده ای استفاده شد، تا زمانی که کاستلانی^{۱۸} و کالمرز^{۱۹} باکتری را به صورت *E.coli* معرفی نمودند. *E.coli* ارگانیسمی است که مطالعات وسیعی از جنبه های مختلف بر روی آن صورت گرفته است، در باکتری شناسی عمومی، به عنوان ارگانیسم مدل در مطالعات ساختار سلولی، رشد و متابولیسم به کار می رود. بعدها از آن در روش های کلونینگ استفاده شده است. *E.coli* برای انجام کنترل کیفی دیسک های آنتی بیوتیکی و مواد ضد عفونی کننده و همچنین به عنوان ارگانیسم شاخص از آلودگی مدفوع، در غذا و آب و محیط به شمار می رود. همچنین نقش مهمی را به عنوان

^{۱۶} Theodore Escherich
^{۱۷} Bacterium coli commune
^{۱۸} Castellani
^{۱۹} chalmers

بخشی از اکوسیستم میکروبی روده انسان و حیوانات خون گرم ایفا می کند. برخی از سویه های آنها پاتوژن های مهمی برای این میزبان ها بوده است [۱۱].

۴-۱ ویژگی های جنس اشریشیا کلی:

اشریشیا کلی باسیل گرم منفی، متحرک، فاقد اسپور و بی هوازی اختیاری است که در روده بزرگ انسان وجود دارد و رایج ترین باکتری گرم منفی جداسازی شده از فلور کلون است که در تولید ویتامین K2 نقش دارند و از استقرار باکتری های بیماریزا در روده جلوگیری می کنند. این باکتری در شرایط بی هوازی، مخلوطی از اسیدها مانند لاکتات، سوکسینات، اتانول، استات و دی اکسید کربن را تولید می کند. رشد بهینه باکتری در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد است اما تا دمای ۴۹ درجه را نیز تحمل کرده و به رشد خود ادامه می دهند. اشریشیا کلی هم در شرایط هوازی و هم بی هوازی می تواند رشد کند. دارای تاژک بوده و به همین خاطر، متحرک هستند. تازه ها متعدد و از نوع پیرامونی^{۲۰} هستند. *E. coli* با استفاده از مکانیسم هایی مانند ترانسفورماسیون^{۲۱}، کانژوگاسیون^{۲۲} و ترانسداکسیون^{۲۳}، ماده ژنتیکی خود را از راه انتقال افقی ژن ها به سایر باکتری های مشابه خود منتقل می کنند. این باکتری، ۱/۰٪ فلور روده را به خود اختصاص داده است. این باکتری از طریق مسیر مدفوعی-دهانی^{۲۴} از یک فرد به فرد دیگر منتقل می شود. بیشتر سویه های اشریشیا کلی، بی آزار هستند اما برخی از سروتیپ ها موجب مسمویت غذایی و اسهال می شوند. این گونه بیشترین عامل ایجاد عفونت ادراری در انسان است همچنین عامل مننژیت نوزادان، اسهال مسافرتی و سایر عفونت های فرصت طلب مانند پنومونی، باکتری می و عفونت زخم می باشد [۸]. *E. coli* یکی از متنوع ترین گونه های باکتریایی است به طوریکه ۲۰ درصد از ژنوم آن بین سویه های مختلف، مشترک است. از

^{۲۰} Peritrichous
^{۲۱} Transformation
^{۲۲} Conjugation
^{۲۳} Transduction
^{۲۴} Oral- fecal

دیدگاه تکاملی، حتی می‌توان شیگلا را نوعی *E.coli* به حساب آورد. اغلب تیپ‌های این باکتری در روده بیمارها نیفتاده ولی برخی از تیپ‌های آن (پاتوتیپ یا ویروتیپ)، توانایی ایجاد بیماری را دارند. اشریشیاکلی انتروتوکسیژنیک^{۲۵} (ETEC) با تولید سم‌های LT^{۲۶} و یا ST^{۲۷} موجب مسمومیت غذایی در مسافران (اسهال مسافران) می‌شود. اشریشیاکلی انتروپاتوژن (EPEC)^{۲۸} با آسیب مستقیم به بافت روده موجب اسهال در کودکان می‌شود. اشریشیاکلی انتروهموراژیک (EHEC)^{۲۹} با ترشح توکسین شیگا^{۳۰} موجب اسهال خونی می‌شود. اشریشیا انترواینویزیو (EIEC)^{۳۱} همانند شیگلا بطور مستقیم با تهاجم بافتی به سلول‌های روده آسیب می‌رساند. اشریشیا اوروپاتوژنیک (UPEC)^{۳۲} در عفونت مجرای ادراری به ویژه سیستم نقش دارد [۸-۱۲].

۵-۱ طبقه بندی

جدول ۱-۱ طبقه بندی علمی اشریشیاکلی به صورت زیر است [۱۲].

Domain:	<u>Bacteria</u>
Kingdom:	<u>Eubacteria</u>
Phylum:	<u>Proteobacteria</u>
Class:	<u>Gammaproteobacteria</u>
Order:	<u>Enterobacteriales</u>
Family:	<u>Enterobacteriaceae</u>
Genus:	<u>Escherichia</u>
Species:	<i>coli</i>

^{۲۵} Enterotoxigenic *E. coli*
^{۲۶} Heat-Labile Toxins
^{۲۷} Heat-Stable Toxin
^{۲۸} Enteropathogenic *E. coli*
^{۲۹} Enterohemorrhagic *E. coli*
^{۳۰} shiga toxin
^{۳۱} Enteroinvasive *E. coli*
^{۳۲} Uropathogenic *E. coli*

طبقه بندی انتروباکتریاسه پیچیده است و با پیدایش تکنیک هایی که فواصل تکاملی را بررسی می کنند مانند هیبریداسیون و تعیین توالی اسید نوکلئیک، به سرعت در حال تغییر است. خانواده انتروباکتریاسه، دارای خصوصیات زیر هستند: آنها باسیل های گرم منفی هستند، یا متحرک اند که در این صورت در سرتاسر محیطشان تاژک دارند یا غیر متحرک اند، آنها در محیط عصاره گوشت یا پپتون بدون اضافه کردن کلرید سدیم یا سایر مکمل ها رشد می کنند. رشد خوب در آگار مک کانکی، رشد به صورت هوازی یا بی هوازی (بی هوازی اختیاری هستند)، تخمیر گلوکز به جای اکسید کردن آن که اغلب همراه با تولید گاز است، از مشخصات آن ها می باشد، آنها کاتالاز مثبت و اکسیداز منفی هستند و نیتрат را به نیتريت احیاء می کنند و ۳۹ تا ۵۹ درصد DNA از C+G درست شده است. هر چه بیشتر در مورد اطلاعات ژنتیکی ارگانیسم ها شناخت پیدا می کنیم، طبقه بندی تاکسونومی گونه ها تغییر می کند. اگر چه در مورد اشريشيا کلی به علت اهمیت بالینی آن این حالت وجود ندارد، به گونه ها و جنس های مختلف تقسیم شده، بطوریکه از متنوع ترین گونه های باکتریایی باقی مانده است و تنها ۲۰٪ ژنوم آن در میان سویه ها مشترک است. در حقیقت از نقطه نظر تکاملی اعضای جنس شیگلا (دیسانتیره^{۳۳}، فلکسنری^{۳۴}، بوییدی^{۳۵} و سونئی^{۳۶}) در واقع سویه ای *E.coli* هستند [۸-۱۲].

۱-۶ طبقه بندی سروتیپ ها

سروتیپ بندی سویه های اشريشيا کلی بر اساس آنتی ژن های O (سوماتیک)، H (فلاژل) و K (کپسولی) انجام می گیرد بطور مثال *E.coli* O157:H7 که یکی از سروتیپ های مهم از EHEC است. آنتی ژن

^{۳۳} *Shigella. dysenteriae*
^{۳۴} *Shigella.flexneri*
^{۳۵} *Shigella.boydii*
^{۳۶} *Shigella.sonnei*

O، قسمتی از لیپوپلی ساکارید (LPS)^{۳۷} است. در واقع، قسمت‌های قندی تکراری (از ۱ تا ۴۰ تکرار) و ایمونولوژیک است که در سطح LPS قرار می‌گیرد. آنتی ژن K همان کپسول است که باکتری را در برگرفته‌است. آنتی ژن H همان فلاژل باکتری است که از جنس پروتئین است. تعداد سروتیپ‌های آنتی ژن O، از O1 تا O181 می‌باشد. تعداد سروتیپ‌های آنتی ژن H از H1 تا H56 است. برخی از این سروتیپ‌ها خاص بعضی از پاتوتیپ‌ها (تیپ‌های بیماریزا) هستند به عنوان مثال، O157:H7، نوعی EHEC است که با تولید توکسین شیکا موجب اسهال خونی می‌شود. یک سویه *E. coli* یک زیر گروه در میان گونه‌هایی است که ویژگی‌ای منحصر به فردی دارد که آنها را از سایر سویه‌های *E. coli* متمایز می‌سازد. این تفاوت‌ها اغلب تنها در سطح مولکولی قابل تشخیص است. با این وجود این تفاوت‌ها می‌تواند در فیزیولوژی یا طرز زندگی باکتری تغییر ایجاد کند. برای مثال یک سویه می‌تواند قابلیت بیماریزایی پیدا کند یا توانایی استفاده از منابع کربن خاص یا توانایی مستقر شدن در یک منطقه‌ای اکولوژیکی ویژه و یا مقاومت نسبت به عوامل ضد میکروبی را به دست آورد. سویه‌های مختلف *E. coli* اغلب اختصاصیت میزبانی دارند که این باعث می‌شود تا منشأ آلودگی مدفوعی را در نمونه‌های محیطی مشخص سازیم. در آنالیز نمونه‌های آب تعیین نوع سویه اشریشیا کلی در خصوص آلودگی مدفوعی و منشأ میزبان آن را به ما می‌دهد. برخی سویه‌ها ویژگی‌هایی را دارند که می‌تواند برای میزبان حیوانی مضر باشد. این سویه‌های ویرولانت بطور معمول باعث شروع ناگهانی اسهال می‌شود که در افراد سالم بالغ آزار دهنده است و در کودکان در کشورهای در حال توسعه کشنده می‌باشد. سویه‌هایی با بیماریزای بیشتر مانند *E. coli* O157H7 باعث بیماری جدی و یا مرگ در افراد بالغ یا افراد با ضعف ایمنی می‌شوند. یک سیستم معمول طبقه‌بندی *E. coli* که بر اساس تفاوت سروتایپینگ آنتی ژن‌های H، O، K باروش سروتولوژیک تقسیم بندی می‌شوند. [۶-۱۲].

۷-۱ نقش اشیریشیا کلی در فلور نرمال

اشیریشیا کلی ارگانیسم اختیاری دستگاه گوارش است. به طور معمول ۴۰ ساعت پس از تولد در دستگاه گوارش نوزاد کلونیزه می شود و در سیستم گوارشی به مخاط روده بزرگ متصل می گردد تا زمانی که این باکتری عناصر ژنتیکی کد کننده فاکتور های بیماری زایی را کسب نکرده باشد به صورت هم زیست باقی می ماند. ونی^{۳۸} و همکارانش در سال ۱۹۹۶ نشان دادند که اشیریشیا کلی گلوکونات موجود در روده را بهتر از دیگر ارگانیسم های ساکن این منطقه مورد استفاده قرار می دهد و شاید به همین دلیل فلور نرمال غالب این ناحیه است اشیریشیا کلی به طور معمول در چند ساعت اولیه پس از تولد در مجاری گوارشی نوزاد مستقر می شود. معمولاً اشیریشیا کلی و میزبان انسانی آن سال ها هم زیستی مسالمت آمیزی به همراه منافع متقابل دارند، به جز در افراد دچار نقص ایمنی و یا جایی که سدهای طبیعی روده مانند پربتونیت شکسته می شوند. سویه های کومنسال اشیریشیا کلی به ندرت باعث ایجاد بیماری می شوند. محل استقرار اشیریشیا کلی های کومنسال لایه مخاطی کلون پستانداران می باشد. این باکتری ها رقیب موفق در مقایسه با جمعیت زیاد سایر باکتری های بی هوازی اختیاری فلور روده ای می باشند. یک فرضیه جالب پیشنهاد می کند که اشیریشیا کلی ممکن است توانایی استفاده از گلوکونات را در کلون با بازده بالاتری نسبت به سایر باکتری ها داشته باشد و از این رو به اشیریشیا کلی اجازه می دهد محل استقرار خود را به طور اختصاصی اشغال کند [۸ و ۹].

۸-۱ مرفولوژی و خصوصیات بیوشیمیایی

باکتری اشیریشیا کلی یک باسیل گرم منفی با اندازه حدود ۱/۵-۱/۱ در ۶-۲ میکرومتر است. این باکتری بی هوازی اختیاری بوده و دو سیستم اکسیداسیون - احیا شامل مناکوئینون،^{۳۹} یوبی کوئینون^{۴۰} دارد که آن را قادر می سازد تا انرژی مورد نیاز خود را از متابولیسم در هردو شرایط هوازی و بی هوازی به دست آورد و از سوبستراهای مختلف برای تغذیه استفاده کند. این باکتری در شرایط بی هوازی با تخمیر بی هوازی مخلوط اسیدی ترکیباتی مانند لاکتات، سوکسینات، اتانول، استات و دی اکسید کربن تولید می کند. تحت شرایط بهینه رشد سرعت تقسیم سلولی بسیار بالاست و هر سلول در عرض بیست دقیقه به دو سلول تقسیم می شود. میدورت و همکارانش در سال ۱۹۹۸ گزارش کردند که زمان لازم برای تقسیم یک سلول در روده کور ۱۰۰ دقیقه می باشد. برای مطالعات اپیدمیولوژیک انتخاب کلنی های لاکتوز مثبت، می تواند باعث از دست دادن تعدادی از نمونه ها شود، زیرا تقریباً ۹۰٪ سویه های اشیریشیا کلی لاکتوز مثبت اند و برخی سویه های اسهال زای اشیریشیا کلی شامل سویه های انتروائینوزیو اشیریشیا کلی، به طور معمول لاکتوز منفی هستند. تست اندول^{۴۱} در بیش از ۹۹٪ اشیریشیا کلی ها مثبت است و مطمئن ترین تست برای افتراق این باکتری از دیگر اعضای خانواده انتروباکتریاسه می باشد. هم چنین این باکتری لیزین دکربوکسیلاز^{۴۲} مثبت بوده و روی محیط TSI^{۴۳} رشد کرده و علاوه بر عدم تولید H₂S،^{۴۴} ظاهر A/A/G ایجاد می کند. تست IMVIC^{۴۵} در این باکتری به صورت (++) می باشد. و همینطور بیش از ۹۰ درصد از انواع اشیریشیا کلی از نظر تولید بتاگلوکوروئیداز^{۴۶} با استفاده از سوبسترای ۴-متیل آمبلی فریل بتا گلوکوروئید^{۴۷} (MUG) مثبت هستند. اشیریشیا کلی توانایی انتقال DNA با استفاده از سه روش کونژوگاسیون، ترانسفورماسیون

^{۳۹} Menaquinon

^{۴۰} Ubiquinon

^{۴۱} indole test

^{۴۲} Delysine Decarboxylase Test

^{۴۳} Triple Sugar Iron Agar

^{۴۴} Hydrogen Sulfide

^{۴۵} I: indole test "M" methyl red test; "V" : Voges-Proskauer , "C" : citrate test

^{۴۶} Beta glucuronidase

^{۴۷} 4-methylumbelliferyl-β-glucuronide

و ترانسداکشن را دارد که موجب انتقال عرضی ماده ژنتیکی بین این باکتری و گونه های نزدیک می گردد. این امر منجر به انتقال صفات مختلف از جمله مقاومت آنتی بیوتیکی و فاکتور های بیماری زایی می شود که یکی از بارزترین مثال ها در این مورد انتقال توکسین شیگا توسط باکتریوفاج از شیگلا به باکتری *E.coli* O157H7 می باشد [۸،۱۳،۱۴،۱۶].



شکل ۱-۱. رنگ آمیزی گرم و نمای میکروسکوپ الکترونی اشریشیاکلی [۱۶].

۹-۱ بیماریزائی و اهمیت بالینی

به هر حال کلون های سازگار یافته مختلفی از اشریشیا کلی وجود دارند که خصوصیات بیماری زایی ویژه ای را کسب کرده اند که باعث افزایش توانایی آن ها در سازگار شدن با مکان های جدید و ایجاد طیف وسیعی از بیماری ها شده است. این خصوصیات بیماری زایی اغلب توسط عناصر ژنتیکی کد می شوند که بین سویه های مختلف جا به جا شده و موجب ایجاد ترکیب های جدیدی از فاکتور های ویروالانس می شوند. فاکتور های ویروالانس منتقل شده، پاتوتایپ های متفاوتی اشریشیا کلی را ایجاد کرده اند که باعث ایجاد بیماری در افراد سالم می شوند. کلون هایی از اشریشیاکلی وجود دارند که با اکتساب خصوصیات بیماری زایی ویژه ای برای بقاء در مناطق جدید، قادر به ایجاد طیف گسترده ای از بیماری شده اند. این خصوصیات بیماری زایی اغلب توسط عناصر ژنتیکی کد می شوند که می توانند بین سویه های مختلف رد

و بدل شده و ترکیبی تازه از فاکتور های ویرو لانس می تواند در سویه وارد شده باقی بماند و آن را به پاتوتایی^{۴۸} خاص از اشریشیا کلی مبدل سازد که توانایی ایجاد بیماری در افراد سالم را دارند. اشریشیاکلی دارای طیف وسیعی از فاکتورهای بیماریزایی می باشد. علاوه بر فاکتورهای مشترکی که در تمام اعضاء خانواده انتروباکتریاسه وجود دارد، سویه هایی از اشریشیاکلی که عامل ایجاد بیماری هایی مانند عفونت های دستگاه ادراری و گاستروانتریت هستند، فاکتورهای بیماریزایی مخصوص به خود می باشند. دو دسته از این فاکتورها، ادهسین ها و اگزوتوسین ها می باشند [۱۳، ۱۶، ۱۴].

۱-۱۰ فاکتورهای ویرو لانس

بیوفیلیم، که اجتماعی از میکروارگانسیم های قرار گرفته در ماتریکسی از پلی مرهای خارج سلولی است، از روش طبیعی زندگی باکتریایی جلوگیری می کند و تصور می شود که مسئول بسیاری از عفونت های سخت و مزمن باشد. اصولاً باکتری ها وقتی تشکیل بیوفیلیم می دهند مقاومت آنها نسبت به شرایط نامساعد محیطی و بیوسایدها زیاد می شوند و از طرف دیگر در بیوفیلیم مواد را نگهداری و تغلیظ می نمایند و از مواد متابولیکی یکدیگر مصرف می کنند. باکتری هایی که دارای مقاومت و یا تحمل نسبت به آنتی بیوتیک ها به دلیل تشکیل بیوفیلیم هستند و سلامتی انسان را تهدید می کنند روز به روز در حال افزایش هستند. در واقع ۶۰٪ عفونت های باکتریایی گسترده در جهان توسط بیوفیلیم به وجود می آید که تحمل زیادی به آنتی بیوتیک های گوناگون دارد [۱۵]. در طی عفونت دسته هایی از EAEC اتصال محکمی را اغلب به واسطه ماتریکس ضخیم بیوفیلیم با اپی تلیوم برقرار می کنند. مکانیسم دقیق ایجاد اسهال توسط این باکتری به خوبی شناخته شده است. گمان می رود EAEC طی اتصال محکم به سلول های اپی تلیال، انتروتوکسین های خود را وارد این سلول ها می کند. تعدادی از فاکتور های بیماری زای بالقوه در این

^{۴۸} گروهی از سویه های متعلق به یک گونه که با داشتن یک سری از فاکتور های مشترک بیماری زایی یک نوع بیماری خاص ایجاد می کنند.

باکتری شناخته شده اند که شامل ادهسین ها توکسین ها، فاکتور انتشاری دیسپرسین و سیستم های به کارگیری آهن می باشد. هیچ یک از این فاکتورها در تمام EAEC ها وجود ندارند و قابل توجه است که اکثر ژن های ویروالانس که در EAEC یافت شده اند و تمام آنهایی که منحصر به EAEC هستند روی پلاسمید قرار دارند و هیچ فاکتور رایجی که به تنهایی فنوتیپ اتصال تجمعی را ایجاد می کند تا به حال شناخته نشده است. در بسیاری از سویه ها یک پلاسمید بزرگ با وزن مولکولی بالاتر از ۶۰ مگا دالتون و اندازه ۱۰۰kb وجود دارد که ژن های متعددی را حمل می کند و ژن های مرتبط با فنوتیپ اتصال تجمعی نیز روی این پلاسمید قرار دارند [۱۷].

۱-۱۰-۱ پیلی

وجود پیلی یا فیمبریه در بیماریزایی باکتریایی دخالت دارد و موجب اتصال باکتری به سطوح مخاطی و اپی تلیال و مجاری ادرار می شود. اما سوش های اتروپاتوژنیک انسانی اشریشیاکلی فاقد این نوع فیمبریه هستند و چسبندگی آن ها غالباً بوسیله فیمبریه حساس به حرارت و مقاوم به مانوز است که به عنوان فاکتورهای کلنی ساز عمل^{۴۹} (CFA) می کنند CFA2 و CFA1 نامیده می شوند. همچنین چسبندگی اشریشیاکلی به فاگوسیت ها توسط فیمبریه حساس به مانوز انجام می گیرد. تاکنون سه نوع پیلی چسبندگی به نام (AAF: AAF/III، AAF/II، AAF/I)^{۵۰} در EAEC شناسایی شده اند که زیر واحد های ساختاری آنها به ترتیب *aggA*، *aafA*، *agg-3* می باشند که روی پلاسمید PAA قرار دارند. روی پلاسمید PAA تنها ژن یکی از پیلی های چسبندگی می تواند قرار گیرد. تولید AAF/I و AAF/II نیاز به فعال شدن *aggR* (فاکتور فعال کننده رونویسی) دارد؛ در حالی که نقش *aggR* در تولید AAF/III ثابت نشده است. اولین عامل چسبندگی EAEC که در سطح مولکولی توضیح داده شده AAF/I می

^{۴۹} colonization factor antigen
^{۵۰} Aggregative Adhesion Fimberia

باشد. کلون کردن AAF/I باعث ایجاد فنوتیپ اگریگیتیو و آگلوتیناسیون گلبول های قرمز در اشیرشیا کلی های غیر بیماری زا شده است. بیان AAF/I نیاز به مناطقی از پلاسמיד ویروالانس PAA دارد که بین قطعات ۹ کیلو دالتونی قرار گرفته اند. یکی از این مناطق شامل ژن زیر واحد ساختاری *aggA* و دیگری شامل ژنی است که یک فعال کننده رونویسی^{۵۱} از نوع *Arac* به نام *aggR* را کد می کند. ژن *AAF/I, aggA* را کد می کند و مسئول فنوتیپ اگریگیتیو و هماگلوتیناسیون گلبول های قرمز انسانی در بعضی سویه ها می باشد. UPEC دارای فاکتورهای اتصال هستند به نام فیمبریه، که به آنها اجازه می دهد تا به طور موفقیت آمیزی عفونت را آغاز می کنند. آدهسین ها انتی ژن های فیمبریایی هستند که باکتری را قادر می سازند تا به موکوس روده متصل شود. از آدهسین های معمول موجود در UPEC می توان به فیمبریا P، فیمبریا S، فیمبریا FIC^{۵۲}، فیمبریا نوع I و خانواده های آدهسین Dr^{۵۳} که شامل آدهسین Dr و آدهسین های فیمبریال می باشد، اشاره کرد. این فیمبریاهای، توسط ژن های *foc, sfa, fim, pap* و *afa* در UPEC کد می شوند [۲۱-۱۸].

۱-۱۰-۲ کپسول^{۵۴}

برخی از باکتری ها توسط لایه های پلی ساکاریدی یا پروتئینی به نام کپسول ها احاطه شده اند. در مواردی نیز یک لایه چسبنده بی شکل و غیره یکپارچه از نظر دانسیته و ضخامت، اطراف باکتری قرار می گیرد که این ماده لایه لعابی^{۵۵} نام دارد. کپسول و لایه های لعابی گلیکوکالیس^{۵۶} نیز نامیده می شوند. انتی ژن K1 کپسولی از جنس پلی ساکارید بوده و مشابه با اسید پلی سیالیک آدهسین سلول عصبی^{۵۷} (NCAM) نوزاد

^{۵۱} Transcriptional activator of the arabinose

^{۵۲} Filamentation induced by cAMP

^{۵۳} Dr Adhesins: Decay-Accelerating Factor Receptor

^{۵۴} Capsul

^{۵۵} Slime Layer

^{۵۶} Glycocalyx

^{۵۷} Neural Cell Adhesion Molecule

می باشد. در ۸۰ درصد سویه های اشريشياکلی مولد مننژيت و سپتي سمی نوزادان وجود دارد. همچنين اين انتی ژن عامل مقاومت به نوتروفیل ها و اثر کشندگی سرم طبیعی است اما به تنهایی برای بیماری زایی کافی نیست. سایر تیپ های کپسولی در همراهی با LPS باعث مهار قدرت کشندگی سرم می شوند [۹-۸].

۱-۱۰-۳ لیپولی ساکارید

لیپولی ساکارید (LPS) اشريشياکلی، زنجیره جانبی O اين اندو توکسين عامل ویژگی ایمنولوژیک و لیپید A قسمت سمی مولکول به شمار می رود. لیپید A در قسمت خارجی غشاء واقع شده و LPS را به غشاء قلاب می کند. LPS اين باکتری باعث مقاومت در برابر واکنش کمپلمان سرم انسان می شود و از باکتری در مقابل اپسونیزاسيون و فاگوسیتوز نیز محافظت می کند [۱۴].

۱-۱۰-۴ فلاژل

اکثر باکتری های گرم منفی ضمایمی سطحی به نام فلاژله را تولید می کنند که باعث حرکت باکتری می شود. فلاژل از سه قسمت تشکیل می شود: ۱) جسم پایه ای که به عنوان موتور چرخشی عمل می کند. ۲) قسمت رشته ای (فیلامنتوس) که به خارج از باکتری راه پیدا کرده و نیروی محرکه را تامین می کند. ۳) قلاب یا هوک که مسئول اتصال اين دو بخش به یکدیگر است [۱۷-۱۴].

۱-۱۰-۵ توکسين ها

در بیماری زایی اشريشياکلی، توکسين های متفاوتی که توسط سویه های مختلف اشريشياکلی به وجود می آیند، دخالت دارند. مانند : pet، شیگا توکسين، وروتوکسين و غيره می توان اشاره کرد [۱۴].

۱-۱۰-۵-۱ توکسین کد شده بوسیله پلاسمید^{۵۸} (*Pet*)

Pet یک سرین پروتئاز^{۵۹} بوده که از نوع پروتئین های اتوترانسپورتر می باشد. علاوه بر نقش انتروتوکسینی، *Pet* دارای فعالیت سیتوتوکسیک علیه سلول های روده ای کشت داده شده و گلبول های قرمز می باشد. فعالیت سیتوتوکسیک احتمالاً از طریق مکانیسم داخل سلولی القاء شده در اثر تخریب پروتئین غشایی اسپکترین^{۶۰} می باشد. بررسی های آزمایشگاهی نشان داده اند که توکسین خالص شده باعث القاء طویل شدن و گرد شدن سلول ها و در ادامه باعث ورقه ورقه شدن سلول ها می شود. ژن *Pet* در میان دسته ای از لوکوس های بیماری زایی روی پلاسمید PAA و در سویه ۴۲ قرار داشته و به نظر می رسد که در ۶۴-۱۸٪ ایزوله های EAEC وجود داشته باشد [۲۲،۲۰،۱۷].

۱-۱۰-۵-۲ شیگا توکسین

این توکسین که توسط فاژ از EHEC به EAEC منتقل شده، در برخی از سویه های EAEC که با فاژ STX لیزوژن شده اند، یافت می شود و موجب ایجاد بیماری هایی از قبیل اسهال خونی، کولیت هموراژیک،^{۶۱} سندرم همولیتیک اورمیک (HUS)^{۶۲} و ترومبوسایتوپنی پورپورا (TTP)^{۶۳} می شوند.

۱-۱۰-۵-۳ وروتوکسین^{۶۴}

اشریشیاکلی انتروهموراژیک EHEC دارای توکسین به نام وروتوکسین می باشد، علت این نام گذاری اثر سیتوتوکسیک این ماده بر سلول های Vero می باشد که رده ای از سلول های کلیه میمون سبز افریقایی

^{۵۸} Plasmid-encoded toxin (*Pet*)

^{۵۹} Serine protease

^{۶۰} Espectrin protein

^{۶۱} Hemorrhagic ischemic colitis

^{۶۲} Acute Urethral Syndrome

^{۶۳} Thrombocytopenic purpura (TTP)

^{۶۴} Vero Toxin

است، که بسیار شبیه شیکا توکسین^{۶۵} که در شیکلا دیسانتری تیپ I می باشد. ورو توکسین شامل دو تیپ عبارتند از VT1 و VT2 می باشد که VT2 شامل زیر واحدهای VT2c, VT2d و VT2e است. VT2c, VT2d در انسان بیماریزا و VT2e همراه با توکسین VT2d در خوک عامل بیماریزا می باشد. وروتوکسین اثر سیتوتوکسینی بر انتروسیت ها دارد و منجر به اسهال می شود، باعث از بین رفتن شبکه مویرگی روده شده و سندرم همولیتیک اورمی^{۶۶} را ایجاد می کند، که شکل شدیدی از یک بیماری اسهالی است. واین سندرم همولیتیک اورمی (شامل: نارسایی حاد کلیه، کم خونی همولیتیک میکرو انژیو پاتیک، ترومبوسیتوپنی) می گردد. از بین سروتیپهای اشریشیاکلی مولد وروتوکسین شایعترین سروتیپ O157:H7 می باشد. این سوش برخلاف اکثر سوش های اشریشیاکلی نمی تواند سوربیتول را مورد استفاده قرار دهد و در अगर سوربیتول مک کانکی رشد آن منفی است [۲۶-۲۳ و ۱۴].

۱-۱۰-۶ آلفاهمولیزین

آلفا همولیزین یک فاکتور ویرولانسی خارج روده ای پروتئینی است که توسط سویه های UPEC تولید می شود. به علت تلاشی کردن گلبول قرمز، به نام همولیزین الفا شناخته شده است. همولیزین آلفا به خانواده ای از پروتئین ها به نام RTX^{۶۷} تعلق دارد، زیرا تمام پروتئین های این خانواده دارای توالی های تکراری دوتایی و پشت سرهم از اسیدهای آمینه ۹ تایی است. تولید همولیزین توسط یک اپرون چهار ژنی صورت می گیرد، تولید همولیزین در افراد مبتلا به عفونت های ادراری اغلب در بین بیماران با پیلونفریت و با عفونت سیستیت^{۶۸} مشاهده شده است. هنوز مشخص نمی باشد که آیا وجود این پروتئین

^{۶۵} Shiga Like Toxin
^{۶۶} Hemolytic uremic syndrome
^{۶۷} Repat in toxin
^{۶۸} Cystitis

در EAEC موجب بیماری زایی روده ای می شود و یا نشانه ای از توانایی بالقوه سویه مورد نظر برای ایجاد بیماری در نواحی خارج روده ای است [۱۴،۱۷،۲۰،۲۲].

۶۹-۱۰-۱ (CNF1)

UPEC، که عامل نکروز کننده سایتو توکسیک (CNF1) را داراست پلی مرآزاسیون F-actin را افزایش می دهد و آلفا همولیزین راسنتز می کند. اپرون hly تشکیل شده از hly A, B, D که سنتز، انتقال و فعال سازی آلفا همولیزین را باعث می شود [۱۴،۱۷،۲۰،۲۲].

۷۰-۱۰-۱ سیتولیزین A

این پروتئین یک توکسین RTX است که توسط ژنی کد می شود که در اکثر سویه های اشریشیا کلی ها وجود دارد [۱۴ و ۱۷].

۹-۱۰-۱ ژن های دخیل در مصرف آهن

این ژن ها روی یک جزیره بیماری زایی که یرسینیا باکتین را کد می کند، قرار دارند و شامل chuA و iucA می باشند. ^{۷۱}ChuA منحصر به گروه های فیلوژنتیک EAEC و DEAC2 است [۱۴،۱۷،۲۰،۲۲].

۷۲-۱۰-۱ ژن AggR

^{۶۹} Cytotoxic necrotizing factor
^{۷۰} cytolysin A
^{۷۱} *E. coli* haem-utilization gene
^{۷۲} Aggregative transcription regulator

در سال ۱۹۹۴ ناتارو و همکارانش نشان دادند در سویه ۲-۱۷ و بر روی پلاسمید بزرگ ۶۰ مگا دالتونی آن ژنی وجود دارد که در بیان AAF/I نقش دارد. ژن های تولید کننده AAF/I (aggA) به صورت دو ناحیه مجزا از هم و به فاصله ۹ kb روی PAA قرار دارند. پس از توالی یابی کامل ناحیه ۲ یک ORF در این ناحیه با طول ۷۹۴ bp کشف شد که پروتئین کد شده توسط آن در بیان AAF/I نقش دارد [۲۷-۱۴و۱۷].

۱-۱۰-۱۱ ژن *aap*

فیمبریه در EAEC دارای بار مثبت بوده و پروتئین دیسپرسین با پوشاندن LPS دیواره باکتری که بار منفی دارد باعث رهایی فیمبریه شده و در نهایت باعث انتشار باکتری در روده می گردد. مونتریو و همکارانش در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که این ژن نه تنها در EAEC که در برخی اشریشیا کلی های غیر بیماری زا و DAEC^{۷۳} نیز دیده می شود [۲۷-۱۴و۱۷].

۱-۱۰-۱۲ ژن *aatA*

در سال ۲۰۰۳ نیشی و همکارانش نشان دادند که ناحیه PAA2 بر روی پلاسمید بزرگ ۶۰ مگا دالتونی یک ABC ترانسپورتر بالقوه کد می کند که مورد نیاز جهت انتقال پروتئین دیسپرسین است. لوکوس مورد نظر گروه ژنی حاوی ۵ ژن می باشد (*aat-PABCD*)^{۷۴}. *aatp*: همولوگ پرمناز غشای خارجی، *aatc*: پروتئین کاست اتصال به ATP، *aatA*: پروتئین غشای خارجی، همولوگ TolC می باشد که، TolC در اشریشیا کلی به عنوان کانالی عمل می کند که می تواند مولکول های متنوعی را از غشا خارجی عبور دهد. این پروتئین کانالی، با ایجاد ساختاری تونل مانند در غشا خارجی، مولکول های

^{۷۳} Diffusely adherent *Escherichia coli* (DAEC)
Escherichia coli (EAEC) virulence genes *aatA*, *aap*, and *aggR* was assayed in strains of different
Diarrheagenic *E. coli* pathotypes and ^{۷۴} nonpathogenic *E. coli*

کوچک (مانند آنتی بیوتیک ها، نمک های صفراوی و حلال های آلی) و یا بزرگ (مانند کلیسین پنج و آلفا همولیزین) را به خارج از باکتری ارسال می کند. اگرچه شباهت توالی بین *aataA* و *TolC* تنها ۲۵٪ می باشد اما شباهت ساختار سه بعدی و داشتن جد مشترک بین دو پروتئین همولوگ بودن آنها را به اثبات می رساند. *aataA* نیز مانند *TolC* در غشای خارجی مستقل از ناحیه ABC قرار دارد و انتقال دیسپرسین به خارج را از طریق ناحیه انتهایی کربوکسی انجام می دهد [۲۷-۱۷ و ۱۴].

۱-۱۰-۱۳ HPI^{۷۵}

جزایر بیماریزایی با نام HPI که کد کننده ی سیستم جذب آهن است. این جزایر با نام HPI ، در EPEC *EAEC* ^{۷۶} , *EIEC* ^{۷۷} *STEC* , *DAEC* حضور دارد [۲۷-۱۷ و ۱۴].

۱-۱۱ بیماری های بالینی

بر اساس ظهور علائم کلینیکی اشیریشیا کلی های پاتوژن به گروه های مختلف تقسیم بندی می شوند:

✓ عفونت های روده ای اشیریشیا کلی

✓ عفونت های خارج روده ای اشیریشیا کلی

۱-۱۱-۱ عفونت های روده ای اشیریشیا کلی

اشیریشیا کلی های اسهال زا متعاقبا به شش زیر گروه تقسیم می شوند که براساس خصوصیت ویرولانسی، مکانیسم بیماریزایی و علائم کلینیکی در اکثر موارد به سروگروپ و سروتایپ های خاصی تعلق می گیرند، اسهال شرایطی است که شخص روزانه سه بار یا بیشتر مدفوع آبکی یا شل دفع کند [۱۷ و ۱۴]. اسهال یکی

^{۷۵} High Pathogenicity Islands

^{۷۶} *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC)

^{۷۷} Shiga-like toxin-producing *E. coli* (STEC or SLTEC)

از عوامل اصلی مرگ در کشورهای در حال توسعه و دومین عامل مرگ کودکان در سراسر دنیا است. از دست دادن مایعات در اثر اسهال میتواند باعث از دست رفتن آب بدن و به هم خوردن تعادل الکترولیت ها در بدن گردد. در سال ۲۰۰۹ تخمین زده شد که اسهال باعث مرگ ۱,۱ میلیون نفر در افراد ۵ ساله و بالاتر و ۱,۵ میلیون نفر کودکان زیر ۵ سال گردیده است. محلولهای نمکی خوردنی و قرصهای حاوی روی انتخاب مناسبی برای درمان اسهال بوده که جان ۵۰ میلیون کودک را در ۲۵ سال گذشته نجات داده است [۲۸]. پاتوتایپ های اشریشیاکلی بر اساس مکانیسم عمل در دستگاه گوارش تقسیم می شوند که دسته ای که با جا گرفتن روی مخاط روده بدون هجوم بافتی عمل میکنند. این دسته فاکتورهایی به نام Adhesion برای چسبیدن به سطح مخاط دارند. همچنین توکسین هایی تولید می کنند که گاهی اثر قابل برگشت بر سلول دارند (سیتوتونین) و گاهی به صورت غیر قابل برگشت عمل می کنند (سیتوتوکسین) و دسته ای که با جا گرفتن روی مخاط روده به همراه هجوم بافتی عمل می کنند. این دسته قدرت هجوم بردن به مخاط را دارند و توانایی بیماری زایی آن ها بر این اساس است. سویه مهم این گروه E.coli O157:H7 می باشد. پاتوژن های روده ای ۶ دسته هستند [شکل ۱-۱].

✓ انتروهموراژیک اشریشیا کلی EHEC

✓ انتروتوکسیژنیک اشریشیا کلی ETEC

✓ انترواگریگیتیو اشریشیا کلی EAEC

✓ انترواینویزیو اشریشیا کلی EIEC

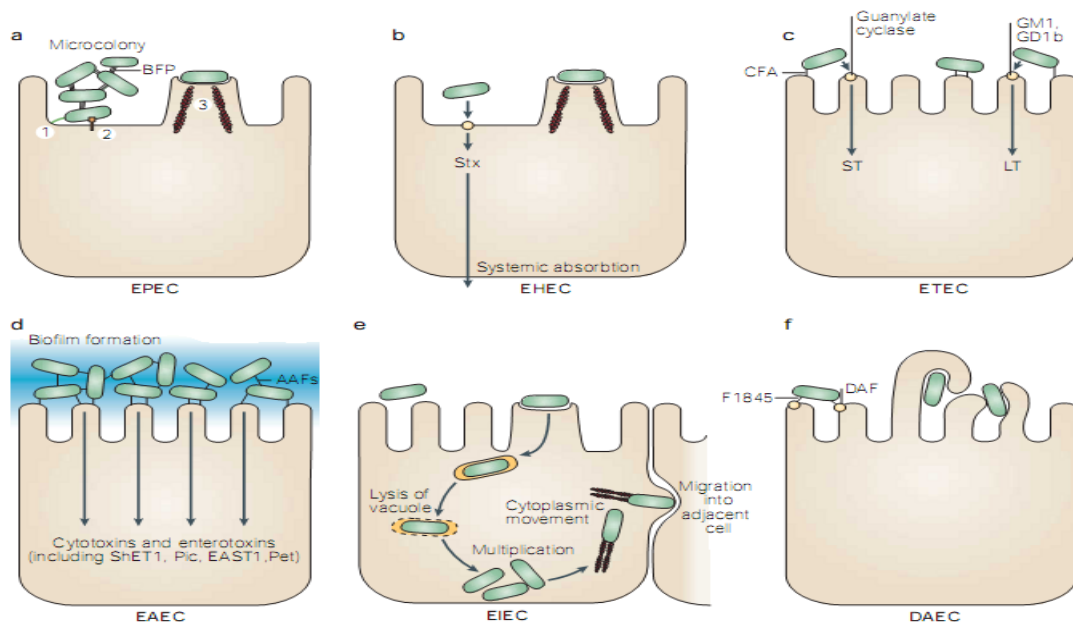
✓ دیفیوزلی ادهرنت اشریشیا کلی DAEC

✓ انتروپاتوژنیک اشریشیا کلی EPEC

که به خوبی تعریف شده اند [۱۷ و ۱۴].

جدول ۱-۲. گاستروانتریت ناشی از اشریشیا کلی [۲۰۱۷ و ۱۴].

پاتوژن	بیماری	مکان عمل	ارگانیزم
انترو توکسین های مقاوم به حرارت/یا حساس به حرارت وابسته به پلاسمید که افزایش ترشح مایعات و الکترولیت ها را تحریک می کنند	اسهال مسافران، اسهال نوزادان در کشورهای در حال توسعه، اسهال ابکی، استفراغ، کرامپ، تهوع تب با درجه پایین	روده کوچک	(ETEC)
هیستوپاتولوژی A/E وابسته به پلاسمید همراه با تخریب ساختار میکروویلی ها که منجر به سوءجذب و اسهال می شود	اسهال نوزادان در کشورهای عقب مانده، اسهال ابکی، استفراغ، مدفوع غیر خونی	روده کوچک	(EPEC)
چسبندگی تجمع یابنده وابسته به پلاسمید باسیل ها (اجرای انباشته روی هم) همراه با کوتاه شدن میکرو ویلی ها، انفیلتراسیون تک هسته ای ها، خونریزی و کاهش جذب مایعات	اسهال نوزادان در کشورهای عقب مانده، اسهال مسافران، اسهال ابکی پایدار همرا با استفراغ، دهیدراتاسیون و تب با درجه پایین	روده کوچک	(EAEC)
به وسیله توکسین های شیکا سایتوتوکسیک 1 (Stx-1) و 2 (Stx-2)، واسطه گری می شود که سنتز پروتئین را تخریب می نمایند. ضایعات (A/E: Attachment Effacement) همراه با تخریب میکروویلی های روده، در نتیجه جذب کاهش یافته	اسهال ابکی اولیه که متعاقبا با اسهال شدید خونی، (کولیت هموراژیک) با کرامپ های شدید شکمی، تب مختصر یا بدون تب، ممکن است به سمت سندروم اورمی همولیتیک پیشرفت نماید	روده بزرگ	(EHEC)
تهاجم وابسته به پلاسمید و تخریب سلول های اپی تلیال استر کولون	بیماری در کشورهای در حال توسعه، تب، کرامپ، اسهال ابکی، ممکن است به سمت دیسانتری با مدفوع خونی اندک پیشرفت نماید	روده بزرگ	(EIEC)



شکل ۱-۲. نمای شماتیک چرخه های بیماریزایی پاتوتایپ های *E.coli* [۱۷].

۱-۱۱-۱-۱ اشريشيا کلي انتروتوکسیژنيک (ETEC)

عامل اسهال کودکان زیر ۵ سال و اسهال مسافران در کشورهای در حال توسعه است. دوره انکوباسیون بیماری بالا می باشد، بنابراین عفونت های اولیه به واسطه مصرف غذا یا آب الوده به مدفوع ایجاد می شوند. انتقال بیماری از فردی به فرد دیگر رخ نمی دهد. اسهال ترشحي^{۷۸} ایجاد شونده بعد از دوره کمون یک تا دو روزه پیشرفت می کند و به طور متوسط سه تا پنج روز باقی می ماند. این علائم عبارتند: کرامپ شکمی، تهوع، استفراغ به ندرت و اسهال ابکی در این بیماران مشابه به اسهال ناشی از ویبریو کلرا بوده ولی علائم آن به ویژه در بالغین، ملایم تر از آن می باشد. تغییرات بافت شناسی در مخاط روده و التهاب مشاهده نمی گردد. ETEC بر سطح مخاطی روده کوچک متصل می شود و انتروتوکسین تولید می کند که منجر به افزایش ترشحات روده ای می گردد. کلونیزاسیون توسط یک یا چندین فیمبریه ی پروتئینی یا فاکتور های کلونیزاسیون فیمبریه ای (CFs) واسطه گری می شود که توسط انتی ژن های فاکتور

کلونیزاسیون (CFA)^{۷۹}، انتی ژن های سطحی کلی یا فاکتور کلونیزاسیون عمومی (PCf)^{۸۰} به ترتیب انجام می شود. بیش از ۲۰ نوع CF متفاوت از نظر انتی ژنی مشخص شده است. مطالعات اپیدمیولوژی اخیر نشان می دهند که تقریباً ۷۵٪ ETEC های انسانی هر دوی CFA/I و CFA/II یا CFA/IV را بیان می کنند. انتی بادی های CFA کلونیزاسیون ETEC را محدود می کنند و بیماری را بهبود می بخشند. ETEC عامل مهم بیماری در حیوانات است و سویه های حیوانی مثل K88 و K99 فاکتور های کلونیزاسیون روده ای را بیان می کنند که در سویه های ETEC انسانی یافت نمی شوند. این ارگانیسم تولید دو نوع انتروتوکسین می نماید: توکسین های حساس به حرارت (LT-I, LT-II)، LT-II در ارتباط به عفونت های انسانی نبوده، و توکسین های مقاوم به حرارت (STa-STb)، توکسین از یک واحد A و پنج زیر واحد B یکسان تشکیل شده است. زیر واحد B به گیرنده گانگلوzyd GM1 و همچنین دیگر پروتئین های سطحی روی سلول اپی تلیال روده کوچک متصل می شوند. توکسین ST-a یک پپتید تقریباً ۲ کیلو دالتونی است که حاوی ۱۸ یا ۱۹ مولکول اسید آمینه است که ۶ تا از آن ها سیستمین است و ۳ پل دی سولفیدی را تشکیل می دهد. رسپتور اصلی آن گوانیلات سیکلاز غشایی است. با اتصال به رسپتور گوانیلات سیکلاز تحریک می شود و منجر به افزایش cGMP داخل سلولی می شود و در نهایت ترشح سلولی را افزایش می دهد. توکسین ST-b مرتبط با بیماری حیوانی است و یک پپتید ۴۸ اسید آمینه ای می باشد که حاوی دو پیوند دی سولفیدی است و می تواند غلظت Ca^{2+} سیتوزولی را بالا برده و باعث افزایش رهاسازی پروستاگلاندین های E2 شود و با آزادسازی سروتونین منجر به افزایش ترشح گردد. پس از اندوسیتوز، زیر واحد A از LT-I از عرض غشاء واکوئل عبور می کند زیر واحد A دارای فعالیت ادنوزین دی فسفات ریبوزیل (ADP)^{۸۱} می باشد و با پروتئین غشایی Gs که تنظیم کننده

^{۷۹} Colonization factor antigens (CFA)

^{۸۰} Popular Colonization Factor

^{۸۱} Adenosine Diphosphate –ribosyltransferase

ادنیل سیکلاز است، تداخل می کند. اثر اصلی این تداخل یک افزایش سطوح اندوزین منو فسفات حلقوی (CAMP)^{۸۲} با افزایش ترشح یون کلر و کاهش جذب یون های کلر و سدیم می باشد. این تغییرات به صورت یک اسهال ابکی تظاهر می کند. توکسین LT-I همچنین ترشح پروستاگلاندین و تولید سایتوکین های التهابی را تحریک می کند که در نتیجه مایعات بیشتری از دست می رود. نتیجه ی این اتصال افزایش فعالیت ادنیلات سیکلاز و نتیجه افزایش سطوح داخل سلولی cAMP و فعال سازی نهایی وابسته به فسفریلاسیون کانال اصلی کلرید سلول های اپی تلیال یعنی تنظیم کننده ی کانال میان غشایی فیبروزیز (CFTR)^{۸۳} می شود. نتیجه فسفریلاسیون CFTR افزایش ترشح Cl⁻ از سلول های ترشحی است که منجر به اسهال می گردد. LT همچنین سنتز پروستاگلاندین ها را تحریک کرده و سیستم عصبی روده ای را تحریک می کند که هر دوی این اعمال باعث تحریک ترشح و مهار جذب می شود. LT همچنین یک ادجوانت مخاطی قوی غیر وابسته به سمیتش است که در بسیاری از واکسن های حاوی انتی ژن شرکت دارد و منجر به افزایش پاسخ انتی بادی به انتی ژن ها می شود و به صورت خوراکی، استنشاقی و حتی داخل عروقی استفاده می شود. Sta یک پپتید منومر کوچک^{۸۴} است که به رسپتور درون غشایی گوانیلات سیکلاز^{۸۵} متصل شده و منجر به افزایش گوانوزین منو فسفات حلقوی (cGMP)^{۸۶} و به دنبال آن ترشح بیش از حد مایعات می شود. ژن های STa و LT-I بر روی پلاسمید قابل انتقال کد می شود، که می توانند همچنین ژن های ادهسین های فاکتور کلونیزاسیون (CFA – I، CFA – II و CFA – III) را حمل نمایند. فاکتورهای کلونیزاسیون فیمبریه هستند که گیرنده های گلیکو پروتئینی اختصاصی میزبان را شناسایی می کنند. برای پیشرفت بیماری هر دو عامل یعنی ایجاد توکسین و فاکتورهای کلونیزاسیون نیاز می باشد. سویه های ETEC عامل اسهال آبکی (۱۴ ساعت) معمولاً بدون خون و مخاط

^{۸۲} Cyclic Adenosine Monophosphate

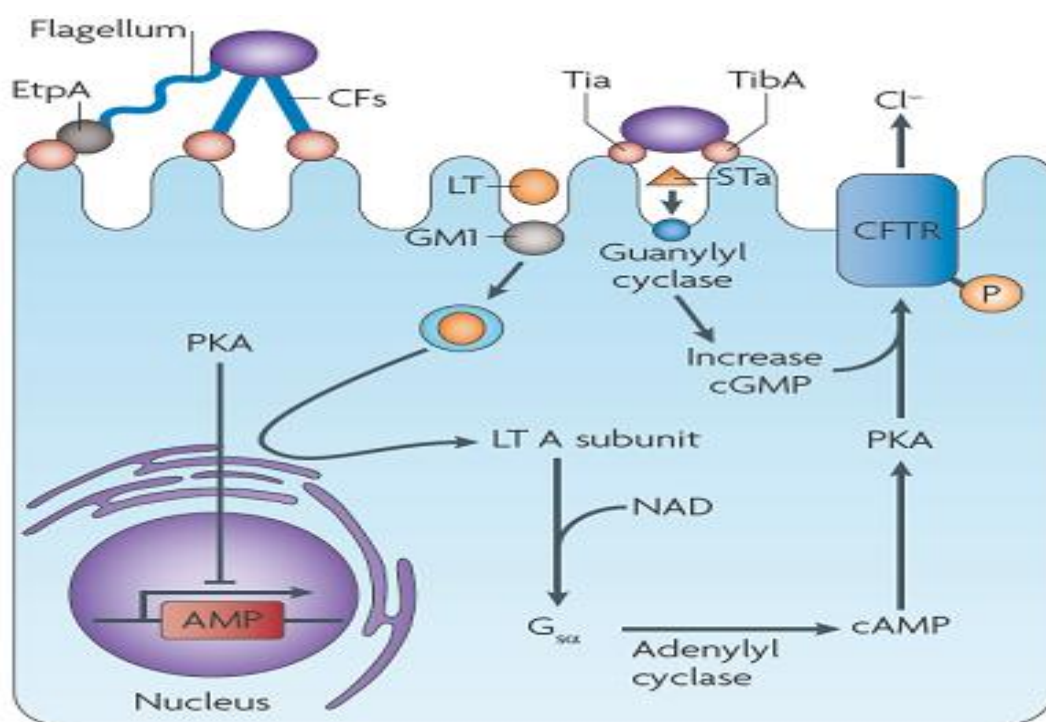
^{۸۳} Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

^{۸۴} Small Monomeric Peptide

^{۸۵} Guanylate Cyclase

^{۸۶} Cyclic Guanosine Monophosphate

بوده و در اکثر موارد تب و استفراغ مشاهده نمی شود. مطالعاتی در خصوص سرکوب سلول های سرطان کولون وابسته به STa گزارش شده است. با توجه به شیوع وسیع ETEC که می تواند STa تولید نماید در کشورهای در حال توسعه در مقابل در کشورهای توسعه یافته، سرطان کولون به نسبت شیوع بالاتری برخوردار است، که می تواند وابسته به نسبت پایین عفونت های ETEC مولد STa باشد [۳۲-۲۹ و ۱۴-۱۳ و ۴].



شکل ۱-۳. نحوه ی ایجاد بیماری به واسطه ی ETEC [۱۷].

۱-۱۱-۲ انترواینویزیو اشیریشیا کلی (EIEC)

انترواینویزیو اشیریشیا کلی یا اشیریشیا کلی مهاجم روده ای، سویه های آن از نظر خصوصیات پاتوژنیک و فنوتیپیک و بیماریزایی شباهت زیادی به شیگلا دارند و باعث ایجاد اسهال شبه شیگلایی می شوند [۳۴-۳۳]. باکتری ها توانای حمله و تخریب سلول های اپی تلیوم کولون و ایجاد بیماری که به صورت اولیه به

شکل اسهال ابکی بروز می نماید را دارند. تعداد اندکی از بیماران به سمت فرم دیسانتری بیماری، تشکیل شده از تب، دردهای شکمی، خون و لوکوسیتوز در نمونه های مدفوعی پیش می روند [۱۷]. روی یک پلاسمید تهاجمی باکتریایی *plnv Genes* یک سری از ژن ها، تهاجم به سلول های اپیتلیال کولون را واسطه گری می نماید که ژن های ضروری در تهاجم (IpaA تا IpaD)^{۸۷} به اپی تلایل را کد می کند. باکتری سپس واکوئل های فاگوسیتی را لیز نموده و در داخل سیتوپلاسم سلول تکثیر می یابد. جابجایی در داخل سیتوپلاسم سلول میزبان و همچنین سلول های اپیتلیال مجاور به وسیله تشکیل دم های اکتین^{۸۸} تنظیم می گیرد (شکل ۱-۴). این روند تخریب سلول های التهابی می تواند به سمت زخم کولون پیشرفت نماید. آسیب بافتی و التهاب در این بیماری به علت PMN ها است. EIEC از نظر بیوشیمیایی، ژنتیکی و بیماریزایی بسیار مرتبط با گونه های شیگلا است. مطالعات بسیاری نشان داده اند که شیگلا و *E.coli* از نظر تاکسونومی در سطح گونه از هم غیر قابل تمایز هستند اما با توجه به اهمیت بالینی شیگلا، تفاوت نامگذاری آن ها همچنان باقی مانده است. ۴ گونه شیگلا که مسئول بیماری در انسان هستند، شیگلا دیسانتریه، شیگلا فلکسنری، شیگلا سونئی و شیگلا بوئیدی هستند که درجات متفاوتی از اسهال را باعث می شوند که با تب، کرامپ های شکمی و اسهال حاوی خون و مخاط مشخص می شود. EIEC می تواند کولیت التهابی مهاجم و اغلب دیسانتری ایجاد کند اما در اکثر موارد باعث ایجاد اسهال ابکی می شود که از سایر عفونت ها در اثر پاتوژن های *E.coli* غیر قابل تمایز است. EIEC توسط چندین تست کوچک بیوشیمیایی از شیگلا جدا می شود. تصور می شود که EIEC کولیت التهابی را ایجاد می کند، با این وجود اکثر بیماران سندرم ترشحاتی روده ی کوچک را نشان می دهند. فاز اولیه بیماریزایی EIEC و شیگلا شامل نفوذ به سلول های اپی تلایل و به دنبال آن لیز واکوئل های اندوسیتوزی، تکثیر داخل سلولی، حرکت در داخل سیتوپلاسم و انتشار به سمت سلول مجاور است. حرکت در داخل سیتوپلاسم توسط اکتین سلولی از

^{۸۷} Invasion Plasmid Antigen
^{۸۸} Actin Tails

یک قطب به قطب دیگر صورت می گیرد. علاوه بر تهاجم و انتشار درون سلول های اپی تلایل، شیگلا و به طور فرض EIEC باعث القا اپوپتوزیز در ماکروفاژ های الوده می شوند. ژن های لازم برای این عمل کمپلکس بیماریزایی است که روی یک پلاسمید بزرگ ویروالانس قرار دارد که در گونه های شیگلا و EIEC یافت می شود. فراوانی پلاسمید ویروالانس 213Kb شیگلا فلکسنری (pWR100) اشاره بر آن دارد که پلاسمید ساختار موزاییکی دارد که حاوی عناصر ژنتیکی ای است که در ابتدا توسط ۴ پلاسمید حمل شده است. یک سوم از ساختار این پلاسمید ها از عناصر ورودی (IS) تشکیل شده که بدون شک در تکامل این پلاسمید های ویروالانس اهمیت دارد. این پلاسمید تیپ سوم سیستم ترشحی و پروتئین های غشای خارجی 120KD به نام IcsA را کد می کند که باعث دپلمریزه شدن اکتین با اتصال به N-WASP^{۸۹} می گردند. رشد میکروویلامنت های اکتین تنها در یک قطب باکتریایی باعث القا حرکت ارگانیسم در سیتوپلاسم سلول اپی تلایل می گردد. این حرکت با تشکیل پیش رفتگی سلولی که سلول های همسایه را در بر می گیرد به اوج می رسد و پس از هر فرایند، فرایند دیگری تکرار می شود. اگر چه EIEC یک باکتری است ولی انتشار به زیر مخاط نادر است. اکثر بیماریزایی EIEC و شیگلا نتیجه اثرات چندگانه ی سیستم ترشحی تیپ III پلاسمیدی است. این سیستم ترشحی چندین پروتئین همچون IpaA, IpaB, IpaC و IpaD ترشح می کند که سیگنالینگ اپی تلیالی، بازچینی اسکلت سلولی، جذب سلولی، لیز واکوئل های اندوسیتوزی و سایر سایر فعالیت ها را واسطه گری می نماید [۴۱-۳۵]. اجزای سیستم ترشحی تیپ III که توسط ژن های *mxi* و *spa* کد می شوند، ایجاد منافذ^{۹۰} حاوی پروتئین های IpaB و IpaC به درون غشای سلول میزبان را ممکن می سازند. علاوه بر تشکیل منافذ IpaB چندین عملکرد دیگر نیز دارد مانند اتصال به پروتئین سیگنالی CD44 که بدان وسیله بازچینی اسکلت سلولی، ورود به سلول و اتصال به کاسپاز ۱ ماکروفاژ منجر به اپوپتوزیز و آزادسازی IL-1 می شود. IpaC پلی

^{۸۹} Neural. Wiskott–Aldrich syndrome protein
^{۹۰} Pore

مریزاسیون اکتین را القا می کند که منجر به تشکیل سلول با فعال سازی GTPase Cdc42 و Rac می گردد. فعالیت پلی مریزاسیون اکتین در انتهای IpaC انجام می پذیرد در حالیکه انتهای امینی این پروتئین گسترش لاملی پودیا است. در مقابل ان IpaA به وینکولین متصل شده و دپلی مریزاسیون اکتین را باعث می شود و از طریق ان به انتشار ان کمک کرده و توسط IpaC ورود باکتری مقدور می شود. پروتئین افکتور^{۹۱} IpaD یک فسفاتاز بالقوه اینوزیتول است که به تشکیل مجدد مورفولوژی میزبان با جدا کردن غشای پلا سمایی سلولی از اسکلت سلولی اکتین کمک می کند و بنابراین باعث می شود که غشا مجدداً برجسته شود. اگر چه سیستم ترشچی تیپ III برای تهاجم سویه های شیگلا و EIEC ضروری است ولی فاکتور های ویرو لانس دیگری شرح داده شده است که شامل سرین پروتئاز، پلاسمیدی کد کننده SepA، سیستم جذب آهن ائروباکتین کروموزومی و سایر پروتئازهایی است که توسط ژن های موجود در جزایر بیماریزایی کد میشوند[۴۲].

^{۹۱} Effector protein

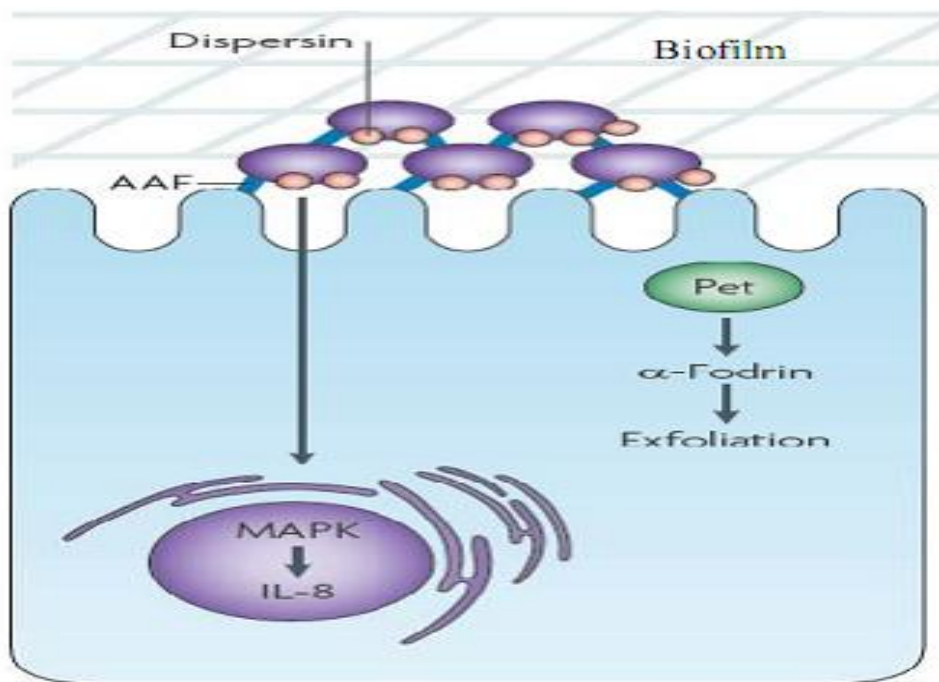
وسیله اتو آگلوتیناسیون خود در یک آرایش اجرهای انباشته شده^{۹۴} مشخص می گردند. این فرایند به واسطه فیمبریه I چسبندگی تجمع کننده (AAF)،^{۹۵} آدهسین هایی که شبیه BFP مسئول تشکیل میکروکلونی در EPEC می باشد، واسطه گری می گردد. همچنین دیگر فیمبریه های چسبنده تجمع کننده (AAF/II, AAF/III) شرح داده شده است. پس از اتصال EAEC به سطح روده ترشح موکوس را تحریک می کند و منجر به تشکیل بیوفیلم ضخیمی می شود که سبب محافظت باکتری از انتی بیوتیک ها و سلول های فاگوسیت کننده می شود. علاوه براین دو گروه توکسین مرتبط با EAEC می باشند: توکسین مقاوم به حرارت انترواگریگیتو^{۹۶} (EAST) و توکسین کد شونده توسط پلاسمید (PET)^{۹۷} می باشد. EAST ترشح مایع را تحریک می کند و از نظر انتی ژنی به توکسین مقاوم به حرارت ETEC وابسته می باشد. PET نیز سبب ترشح مایع می شود. EAEC به طور فزاینده ای به عنوان عامل اغلب اسهال های دائمی در کودکان و بزرگسالان در کشور های در حال توسعه و پیشرفته و به عنوان عامل چندین همه گیری ناگهانی در سراسر دنیا شناخته شده است. در حال حاضر EAEC به عنوان *E.coli* یی که LT و ST ترشح نمی کند و به سلول های HEP-2 به صورت تجمع یافته، که در آن باکتری ها به صورت اجر های روی هم انباشته متصل می گردند، تعریف می گردد. احتمال دارد که این تعریف شامل هر دوی کلون های پاتوژن و غیر پاتوژن باشد و هنوز این قضیه که آیا EAEC ها، فاکتور های مشابهی دارند که در فنوتیپ اتصال مشترک است مورد بحث است. ولی با این وجود پاتوژن بودن EAEC برای انسان اثبات شده است [۱۷ و ۳۲]. استراتژی پایه ای عفونت EAEC احتمالاً به طور غالب، کلونیزاسیون روی مخاط روده ای و به دنبال آن ترشح انتروتوکسین و سیتو توکسین است [۲۲]. مطالعات بر روی بافت روده ای انسان اشاره دارد که EAEC آسیب مخاطی مهم اما ملایمی القا می نماید [۴۳]. که این اثرات در

^{۹۳} Growth Retardation
^{۹۴} Arrangement Stacked-Brike
^{۹۵} Aggregative Adherence Fimbrial
^{۹۶} Enteroaggregative Heat Stable Toxin
^{۹۷} Plasmid Encoded Toxin

قسمت های روده بزرگ بسیار شدید هستند. تغییرات التهابی ملایم در مدل های حیوانی عفونی حضور لایه های ضعیفی از باکتری های خود تجمع یافته با اتصال سست به سطوح مخاطی را نشان می دهد [۴۶-۴۴].

سویه های پروتوتایپ EAEC به سلول های HEP-2 و مخاط روده ای توسط ساختار های فیمبریه ای به نام فیمبریه های اتصال تجمعی (AAFs) اتصال پیدا می کند که مرتبط با خانواده Dr از ادهسین هاست [۴۷-۴۸]. حداقل ۴ واریانت الی از AAFs وجود دارد اما به صورت مهمی هر کدام از آن ها در تنها تعداد کمی از سویه ها حضور دارد. باید ذکر کرد که با این وجود تمام سویه های ESEC توسط AAFs اتصال پیدا نمی کنند. اخیرا یک پروتئین توصیف شده است که دیسپرسین نام دارد و یک لایه نازک روی غشای سویه های EAEC تشکیل می دهد و به نظر می رسد با اثرات تجمعی AAFs مداخله می کند [۱۸]. یک ساختار سطحی دیگر که بالقوه در گیر ایجاد التهاب است، یک پروتئین فلاژلین EAEC است که ازاد سازی IL-8 را القا می کند و آزاد شدن این سایتو کاین مهاجرت نوتروفیل ها را در طول اپی تلیم تحریک می کند و باعث ایجاد تخریب بافتی و ترشح مایعات می شود [۱۹]. چندین توکسین برای EAEC شرح داده شده است. دو نوع از این توکسین ها توسط لکوس کروموزومی مشابه بر روی دو رشته مخالف کد می شود. ژن بزرگتر پروتئاز خود منتقل شونده با فعالیت موسینازی را کد می کند که Pic نام دارد. رشته مخالف انترو توکسین الیگومری را کد می کند که به عنوان انتروتوکسین ۱ شیگلا (ShET-1) نامیده می شود که در اکثر سویه های شیگلا فلکسینری 2a وجود دارد [۴۹]. حالت فعالیت ShET هنوز هنوز مشخص نشده است اما می تواند در اسهال ترشحاتی در عفونت EAEC و شیگلا شرکت داشته باشد. انترو توکسین دوم که در بسیاری از سویه ها وجود دارد EAEC-ST (EAST-1) است که ۳۸ اسید آمینه مشابه توکسین ST-a در ETEC دارد [۵۰]. امکان دارد که EAST-1 در اسهال ابکی در سویه هایی که ان را دارند، شرکت داشته باشد. با این وجود ژن EAST-1 (astA) می تواند در بسیاری از

نمونه های کومنسال *E.coli* یافت شود و از این رو نقش آن در اسهال به صورت یک سوال باقی مانده است [۵۱]. بسیاری از سویه های EAEC توکسین خود انتقالی به نام Pet ترشح می کنند که بر روی پلاسمید ویروالانس بزرگی در همسایگی ژن کد کننده AAF کد می شود. Pet فعالیت انترو توکسینی دارد و نیز می تواند به طور بالقوه منجر به تغییرات در اسکلت سلولی و گرد شدن سلول های اپی تلیال با شکست پروتئین اسپکتین اسکلت سلولی شود [۲۰]. اگر چه فاکتور های ویروالانس واحدی در همراهی با ویروالانس EAEC وجود ندارد اما مطالعات اپیدمیولوژیک یک بسته ی پلاسمیدی و کروموزومی از فاکتور های ویروالانس را نشان می دهند که مشابه فاکتور های ویروالانس سایر پاتوژن های روده ای است. چندین فاکتور ویروالانس EAEC توسط یک فعال کننده رونویسی به نام AggR که عضوی از خانواده ی AraC فعال کننده رونویسی است، تنظیم می گردد [۳۷]. یک بررسی مداوم بر روی مطالعات اپیدمیولوژیکی EAEC ارتباط رگولون AggR با بیماری اسهالی را نشان می دهد. جیانگ و همکارانش به تازگی عنوان کردند که حضور ژن های مرتبط با رگولون AggR گویای افزایش قابل ملاحظه غلظت هایی از IL-8 و IL-1 مدفوعی در بیماران با اسهال در اثر EAEC است. پیشنهاد شده است که نام EAEC تیپیک، بایستی برای سویه های حامل AggR و حداقل زیر گروهی از ژن های تنظیم شوند توسط AggR به کار رود و نام EAEC آتیپیک برای سویه های فاقد رگولون AggR استفاده شود [۲۱].



شکل ۱-۵. نحوه ی ایجاد بیماری به واسطه ی EAEK [۱۷].

۱-۱۱-۱-۴ اشريشيا کلي انتروهموراژيک (EHEC)

اشريشيا کلي انتروهموراژيک (EHEC) يا VTEC يا STEC شايعترين پاتوتیپ بیماری زا در کشورهای توسعه یافته است. می تواند سبب اسهال غیرخونی در کودکان ۱ تا ۵ ساله شود. از جمله زیر گروه های اشريشيا کلي تولید کننده ی شيگا توکسين می باشند که باعث ایجاد اشريشیاکلي انتروهموراژيک می باشد که تا کنون باعث کولیت هموراژيک^{۹۹} و سندرم همولیتیک اورمیک (HUS) در انسان می شوند بیشتر در ماه های گرم سال شایع بوده است. در بیشتر موارد بیماری افراد مبتلا از گوشت پخته گاو یا تولیدات گوشتی دیگر آن، شیر غیر پاستوریزه، آب میوه ها مانند: شراب تهیه شده از سیب الوده به مدفوع گوساله، سبزیجات خام و میوه ها می باشد. مصرف کمتر از ۱۰۰ باکتری می تواند بیماری ایجاد نماید و انتقال فرد به فرد رخ دهد. بیماری ایجاد شده از اسهال خفیف ساده تا کولیت هموراژيک با درد شدید

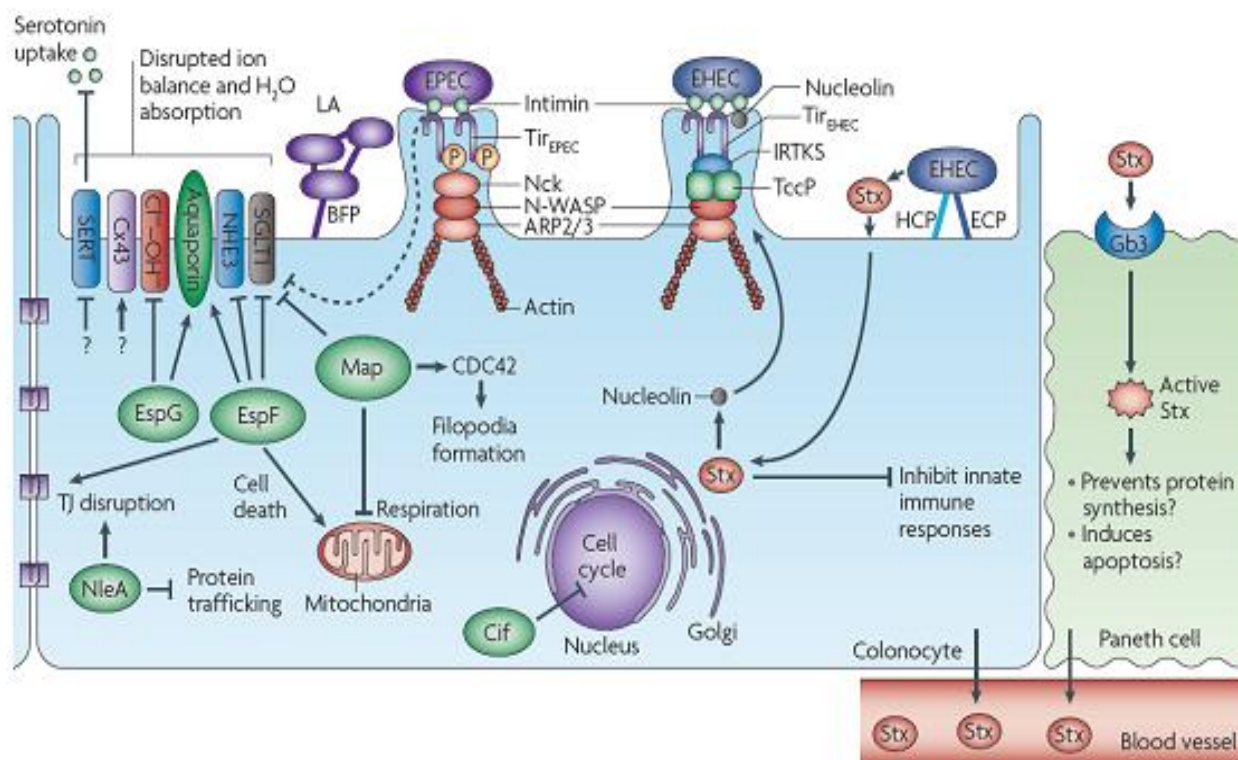
شکمی و اسهال خونی متغیر است. به صورت اولیه اسهال با درد شکمی پس از دوره کمون سه تا چهار روزه در بیماران گسترش می یابد. استفراغ تقریباً در نیمی از بیماران دیده می شود اما یک تب بالا معمولاً وجود ندارد. در طی دو روز پس از بروز بیماری در ۳۰ تا ۶۵ درصد بیماران به طرف اسهال خونی با درد شکمی پیش می روند. بهبودی کامل علائم به طور تیپیک پس از چهار تا ده روز در بیشتر بیماران درمان نشده رخ میدهد. سندرم همولیتیک اورمی یک اختلال است که به وسیله نقص کلیوی حاد،^{۱۰۰} ترومبوسیتوپنی^{۱۰۱} و انمی همولیتیک میکروانژیوپاتیک^{۱۰۲} مشخص گردد، یک عارضه در پنج تا ده درصد بچه های الوده شده جوان تر از ده سال است. بهبودی علائم در بیماری ساده پس از چهار تا ده روز در بیشتر بیماران درمان نشده رخ می دهد با این وجود مرگ می تواند در ۳ تا ۵ درصد بیماران مبتلا به سندرم همولیتیک اورمی اتفاق بیافتد. شایع ترین سویه EHEC، سروتیپ *E.coli* O157:H7 می باشد. این سویه یک کپی مشتق شده از EPEC را نشان می دهد و فعالیت چسبندگی و محو کنندگی^{۱۰۳} را بیان می کند. علاوه بر این، سویه ها توکسین شیگا یعنی St-2، St-1 و یا هر دو را کسب نموده اند. St-1 اساساً شبیه توکسین شیگا تولید شده توسط شیگلا دیسانتری می باشد، St-2 دارای ۶۰ درصد هومولوژی می باشد. هر دو توکسین به وسیله باکتریوفازهای لیزوژنیک^{۱۰۴} کسب می گردند. هر دو دارای یک زیرواحد A و پنج زیر واحد B یکسان تشکیل شده است. زیر واحد B به گلیکولیپید خاصی روی سلول میزبان، گلوبوتری اسیل سرامید^{۱۰۵} (Gb3) متصل می گردد. غلظت بالایی از گیرنده های Gb3 در پرزهای روده ای و سلول های اندوتلیال کلیوی یافت می شود. پس از اینکه زیر واحد A وارد شد، به دو مولکول شکسته می شود و قطعه A1 به قسمت 28S اسید ریبونوکلئیک ریبوزومی متصل گشته و سنتز پروتئین قطع می گردد. سویه های EHEC که دارای هر دو توکسین شیگا و فعالیت چسبندگی و محو

Acute Renal Failure^{۱۰۰}
 Thrombocytopenia^{۱۰۱}
 Hemolytic Anemia Microangiopathic^{۱۰۲}
 Attaching and Effacing Activity^{۱۰۳}
 Lysogenic Bacteriophages^{۱۰۴}
 Globotriasyl Ceramide^{۱۰۵}

کنندگی هستند بیماریزاتر از سویه هایی می باشند که فقط توکسین شیگا را تولید می نمایند. سندرم همولیتیک اورمی ترجیحا با تولید Stx-2 مرتبط می باشد که سبب تخریب سلول های اندوتلیال گلومرولی می باشد که این آسیب منجر به فعال شدن پلاکت ها و تخریب ترومبین می گردد و در نتیجه فیلتراسیون گلومرولی کاهش می یابد و نقص کلیوی حاد رخ می دهد. توکسین های شیگا همچنین بیان سایتوکین های التهابی مانند: فاکتور نکروز کننده توموری گاما^{۱۰۶} (TNF-Gama) و اینترلوکین ۶ را تحریک می نمایند دیگر اثرات بیان گلیکو لیپید Gb3 افزایش می یابد. علاوه بر stx اکثر سویه های EHEC دارای جزایر بیماریزایی LEE^{۱۰۷} نیز هست که تیپ سوم سیستم ترشحی و پروتئین های افکتوری کد می کند که مشابه آن هایی است که توسط EPEC تولید می شود. نام EHEC تنها برای سویه های stx مثبت که حاوی LEE نیز هستند استفاده می شود. با این وجود سویه های STEC بدون LEE وجود دارند که درارتباط با بیماری هستند مانند سویه های *E. coli* O103H21 که نشان می دهد فاکتورهای ویروالانس دیگری وجود دارد که بایستی شناخته شوند. چندین فاکتور اتصالی دیگر برای سویه های *E. coli* O157H7 یا سویه های غیر *E. coli* O157H7 توصیف شده اند که البته هنوز اهمیت این فاکتورها در ایجاد بیماری در انسان بخوبی مشخص نشده است. یک ادهسین پروتئینی ۳۶۲kb بزرگ (ToxB) که بر روی پلاسمید ۹۳kb کد می شود در سویه های *E. coli* O157H7 و سایر سویه های EHEC وجود دارد. این پروتئین شباهت توالی با خانواده ی توکسین کلسترییدیوم و پروتئین LifA در EPEC و پروتئین Efa-1 دارد که به عنوان ادهسین سویه های *E. coli* O157H7 در EHEC عمل می کند. این پلاسمید (pO157) یک توکسین RTX را کد می کند که شبیه همولیزین UPEC سرین پروتئاز (EspP) کاتالاز و پروتئین StcE می باشد. StcE مهار کننده ی استرازی ۱C (INH-۱C) مسیر کمپلمان را شکسته و در تخریب بافتی ادم و ناهنجاری های ترومبوتیک که در عفونت های EHEC دیده می شود شرکت می کند. توالی ژنومی

Tumor necrosis factor gamma^{۱۰۶}
Locus of Enterocyte Effacement^{۱۰۷}

E. coli O157H7 جزایر کروموزومی زیادی را نشان می دهد که فاکتورهای ویروالانس دیگری را رمز می نمایند. درمیان این فاکتورها فیمبریه، سیستم جذب آهن و اووره از وجود دارد که شبیه آن هایی است که توسط کلبسیلا و سایر پاتوژن های دستگاه ادراری تولید می شود [۵۷-۵۲ و ۳۲-۲۶ و ۲۳].

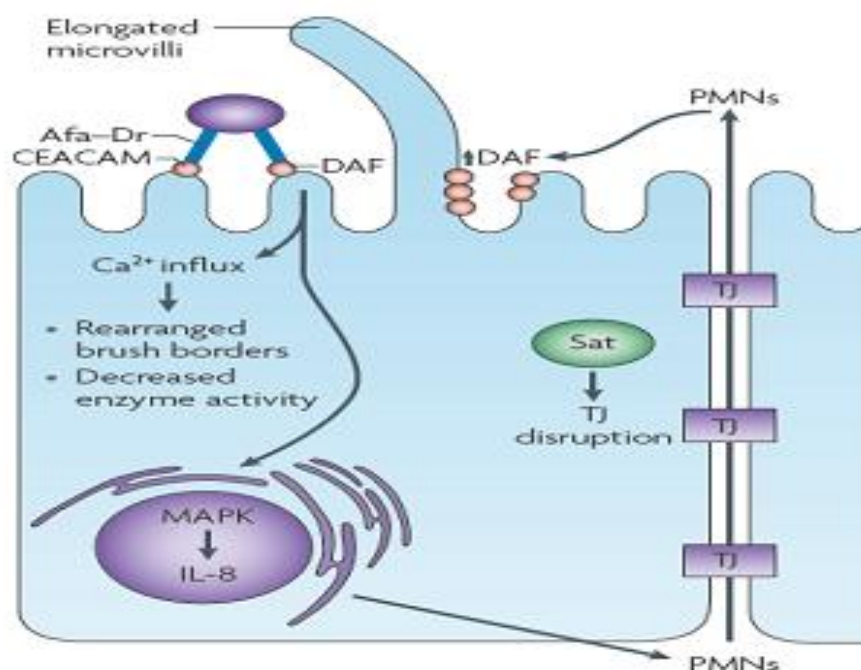


شکل ۱-۶. نحوه ی ایجاد بیماری به واسطه ی EHEC و EPEC [۱۷].

۱-۱۱-۵ دیفیوزلی ادهرنت اشیریشیا کلی (DAEC)

این سروتیپ به واسطه ویژگی چسبندگی آن به سلول های محیط کشت که فنوتیپ DA^{+} نام دارد تشخیص داده می شود دارای آدهسین های خانواده Afa/Dr (AIDA) هستند. این ارگانیزم ها، طویل شدن شبه انگشتی میکرو ویلی ها را القاء می کند. DAEC توسط حضور مدل اتصال منتشر به سلول های تک لایه ای HEP-2 مشخص می گردد. این باکتری در چندین مطالعه به عنوان عامل اسهال به ویژه در

کودکان بزرگتر از ۱۲ ماه نشان داده شده است [۵۸ و ۱۷ و ۱۴]. تقریباً ۷۵٪ سویه های DAEC یک ادهسین فیمبریه ای بزرگ به نام F1845 تولید می کنند که متعلق به خانواده ی Dr ادهسین هاست که از DAF یا کوسیالو فسفاتیدیل اینوزیتول متصل به پروتئین که به طور نرمال از سلول ها در برابر آسیب کمپلمان محافظت می نماید [۵۹]، به عنوان یک رسپتور استفاده می کند [۶۱-۶۰]. سویه های DAEC اثر سایتوپاتیک را القا می نماید که با ایجاد زوائد سلولی بلند که اطراف باکتری را متصل را در بر می گیرد مشخص می شود. این ویژگی به اتصال و تجمع رسپتور DAF توسط فیمبریه ی Dr نیاز دارد [۶۲]. اتصال ادهسین Dr با فعالسازی ابشار سیگنال ترانسداکشن همراه می شود که شامل فعالسازی کیناز PI-3 است [۶۱]. Peiffer و همکارانش گزارش کرده اند که عفونت رده های سلولی روده توسط سویه های DAEC فعالیت ساکراز ایزو مالتوز را افزایش و دی پپتیدیل پپتیداز IV را کاهش می دهد [۶۳]. این اثر غیر وابسته به مسیر DAF است و ممکن است مکانیسمی برای بیماری های روده ای باشد که توسط DAEC ایجاد می گردد و همچنین اشاره به فاکتور های ویروالانسی به غیر از ادهسین های Dr دارد. Tieng و همکارانش پیشنهاد داده اند که DAEC می تواند بیان MICA^{۱۰۹} را توسط سلول های اپی تلایال روده ای القا کند که نشان می دهد که عفونت DAEC می تواند پیش التهابی باشد. این اثر در ایجاد بیماری های التهابی روده اهمیت بالقوه ای می تواند داشته باشد [۶۴].



شکل ۷-۱. نحوه ی ایجاد بیماری به واسطه ی DAEC [۱۷].

۶-۱-۱۱-۱ اشريشيا کلي انتروپاتوژنيک (EPEC)

اولين گروه از سويه هاي *E.coli* است که به عنوان عامل اسهال در کودکان با بروز ناگهانی در کشورهای در حال توسعه از ۱۹۴۰ تا ۱۹۵۰ گزارش شد. اين سويه ها سويه ی شاخص پاتوژن های خانواده ی اتصال و نابودی (A/E)^{۱۱۰} می باشند [۱۷]. EPEC توسط Neter در ۱۹۵۵ نامگذاری شد که نشان می دهد که توکسين توليد نکرده و مهاجم نمی باشد [۶۵]. امروزه یکی از مهم ترین عوامل ایجاد کننده اسهال در کودکان است که کودکان کمتر از ۶ ماه را در سراسر دنیا متاثر می سازد [۱۷]. سويه ی EPEC ای که در بسیاری آزمایشگاه های مرجع *E.coli* مطالعه می شود E2348/69 می باشد که از بروز ناگهانی اسهال از Taunton انگلستان در ۱۹۶۹ جداسازی شد [۱۷]. عمده ترین علایم بیماری ایجاد شده توسط EPEC اسهال حاد آبکی با شدت متفاوت می باشد و گزارش هایی از اسهال های مزمن نیز وجود دارد [۶۶].

^{۱۱۰} Attachment & Effacement

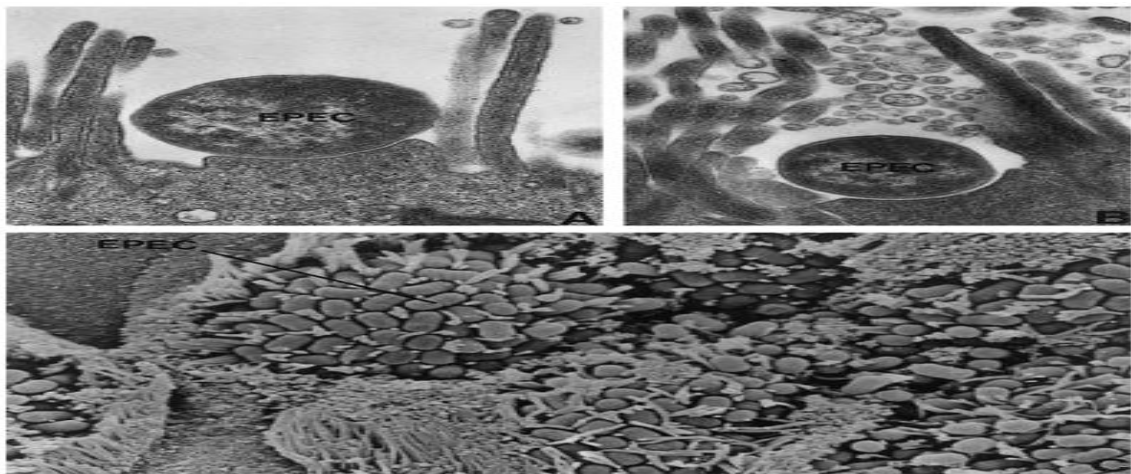
علاوه بر اسهال سایر علائم شامل استفراغ، تب و از دست رفتن مایعات می باشد [۱۷و۵۸]. EPEC در روده ی کوچک کلونیزه شده و در افراد ی با زمینه ی سالم اسهال با دوز عفونت بالا (10^8-10^{10}) ایجاد می کند. با این وجود بنظر می آید که دوز عفونی طبیعی پایین تر از این باشد [۱۷]. با وجود اینکه بروزهای ناگهانی گسترده اسهال کودکان در اثر EPEC بطور قابل ملاحظه ای در کشورهای صنعتی دیده شده است اما EPEC به عنوان مهم ترین عامل بالقوه ی اسهال کودکان در کشورهای در حال توسعه باقی مانده است [۱۷]. تا سال ها، مکانیسمی که توسط آن EPEC باعث اسهال می شد ناشناخته مانده بود و این پاتوتایپ تنها بر اساس سروتیپ O:H شناسایی می شد. با این وجود از ۱۹۷۹ پیشرفت های فراوانی در شناخت ما از بیماریزایی اسهال EPEC بوجود آمده است بطوریکه EPEC امروزه جزء شناخته ترین پاتوتایپ های *E.coli* می باشد. مشخصات هیستوپاتولوژی روده مرتبط با عفونت های EPEC با عنوان اتصال و نابودی (A/E) تعریف می شود. باکتری در ابتدا به سلول های اپی تلیال روده ای متصل می شود و تغییرات بزرگی را در اسکلت سلولی بوجود می آورد که شامل تجمع اکتین پلی مریزه شده، درست در زیر باکتری اتصال یافته است. میکروویلی های روده نابود می شوند و ساختارهای پدالی ماندی رویشان بوجود می آید که اغلب از سطح سلول اپی تلیال بیرون زده است. توانایی القاء اثرات هیستوپاتولوژیک A/E توسط ژن هایی بر روی جزایر بیماریزایی ۳۵kb کد می شود که لوکوس از بین برنده ی انتروسیت (LEE) (نامیده می شود [۶۷]). مشابه LEE در سایر پاتوژن های انسانی و حیوانی یافت می شود که هیستوپاتولوژی A/E را ایجاد می کنند مانند EPEC, EHEC خرگوش^{۱۱۲} و سیتروباکتر رودنتیوم که در موش هایپرپلازی روده ایجاد می کند. LEE یک پروتئین غشای خارجی ۹۴kb کد می کند بنام اینتیمین^{۱۱۳} که اتصال اولیه EPEC را به سلول های اپی تلیال میانجی گری می کند. اینتیمین تنها به عنوان لیگاند برای

^{۱۱۱} Locus for enterocyte effacement (LEE)

^{۱۱۲} Rabbite EPEC

^{۱۱۳} Intimin

اتصال به سلول های اپی تلیال عمل نمی کند بلکه پاسخ ایمنی TH1 مخاط را نیز تحریک نموده و هیپرپلازی بوجود می آورد. اکثر ۴۱ قالب بازخواندنی هسته ی LEE در جزایر بیماریزایی، پروتئین های تیپ سوم سیستم ترشحی^{۱۱۴} را کد می کنند که مرتبط با چاپرون ها و پروتئین های افکتوری می باشد. یکی از این پروتئین های افکتور Tir^{۱۱۵} نامیده می شود که به غشای سلول میزبان به عنوان رسپتور برای پروتئین غشای خارجی ایتیمین وارد می شود. این مورد یک مثال جالب برای پاتوژنی است که رسپتور خودش را برای اتصال به سلول یوکاریوتی فراهم می آورد [۶۸-۶۹].

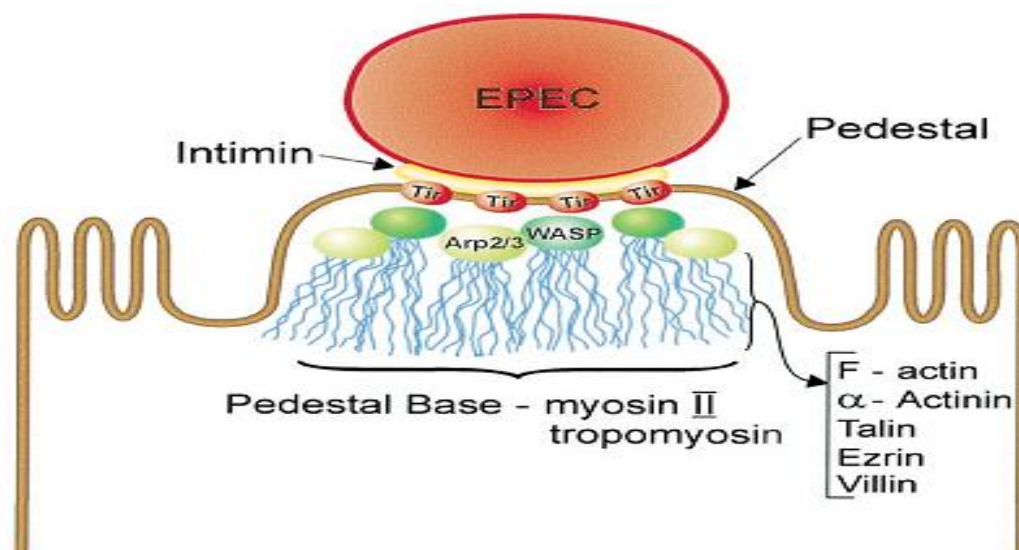


شکل ۸-۱. نمای میکروسکوپ الکترونی از یک ضایعه ی A/E در EPEC [۷۰].

البته وجود پروتئین های یوکاریوتی دیگری نیز به عنوان رسپتور ایتیمین گزارش شده است. مطالعات اخیر نشان داده است که EPEC می تواند قطبیت سلول را نیز از بین ببرد و باعث القاء پروتئین های غشایی مانند $\beta 1$ اینتگرین ها شود که آن ها را به سمت راس سلول های سطحی ببرد که بتوانند به ایتیمین متصل شوند [۷۱]. علاوه بر $\beta 1$ اینتگرین ، Tir نیز به نوکلئولین متصل می شود [۷۲]. Tir علاوه بر نقشی که به عنوان رسپتور ایتیمین دارد، اعمال سیگنالی مهمی را در سلول های اپی تلیال ایفا می کند. قسمتی از

Tir که در تماس با پروتئین اسکلت سلولی سیتوزول است مستقیماً^{۱۱۶} به پروتئین سازگاری Nck متصل می شود که N-WASP و کمپلکس مرتبط بااکتین 2/3 (Arp2/3)^{۱۱۶} را به کار گرفته که منجر به تجمع رشته های اکتینی و آغاز کمپلکس مشخص زخم های پدالی می گردد. پروتئین Tir در EHEC O157:H7 مشابه پروتئین Tir در EPEC O126:H6 عمل نمی کند زیرا تشکیل پدال ها غیروابسته به Nck است، که نشان دهنده ی وجود سایر فاکتورهای باکتریایی است که سیگنالینگ اکتین را آغاز می کنند[۷۳]. سایر پروتئین های اسکلت سلولی مانند وینکولین^{۱۱۷}، کورتاکتین^{۱۱۸}، تالین^{۱۱۹} و α اکتینین^{۱۲۰} توسط کمپلکس پدالی به کار گرفته می شوند[۷۴]. تشکیل پلاک ها یک فرایند دینامیک است که طی آن نیروی پلی مریزاسیون اکتین را به سمت سطح سلول های اپی تلیال ptK2 سوق می دهد [۷۵]. Tir هم چنین ساختار GAP^{۱۲۱} را دارد که در توانایی Tir در تنظیم منفی فیلوپودها^{۱۲۲} دخالت می کند[۷۶]. دیگر افکتور مولکول ترشچی EspF^{۱۲۳} است که باعث اپوپتوز شده و انتشار دوباره ی پروتئین اولکودین مرتبط با اتصالات محکم را القا می نماید که منجر به از دست رفتن مقاومت الکتریکی میان غشایی می گردد. پروتئین Map^{۱۲۴} بر روی عمل میتوکندریایی و تشکیل فیلوپودها و سایر فاکتورها مانند EspG و EspH که اخیراً^{۱۲۵} شناسایی شده اند تاثیر می گذارد [۷۷].

^{۱۱۶} Actin-related protein 2/3 (Arp2/3)
^{۱۱۷} vinculin
^{۱۱۸} Cortactin is essential for F-actin
^{۱۱۹} Talin
^{۱۲۰} Alfa-Actin
^{۱۲۱} GTPase-activating protein
^{۱۲۲} filopodia
^{۱۲۳} EPEC secretion protein F
^{۱۲۴} Mitochondrial associated protein



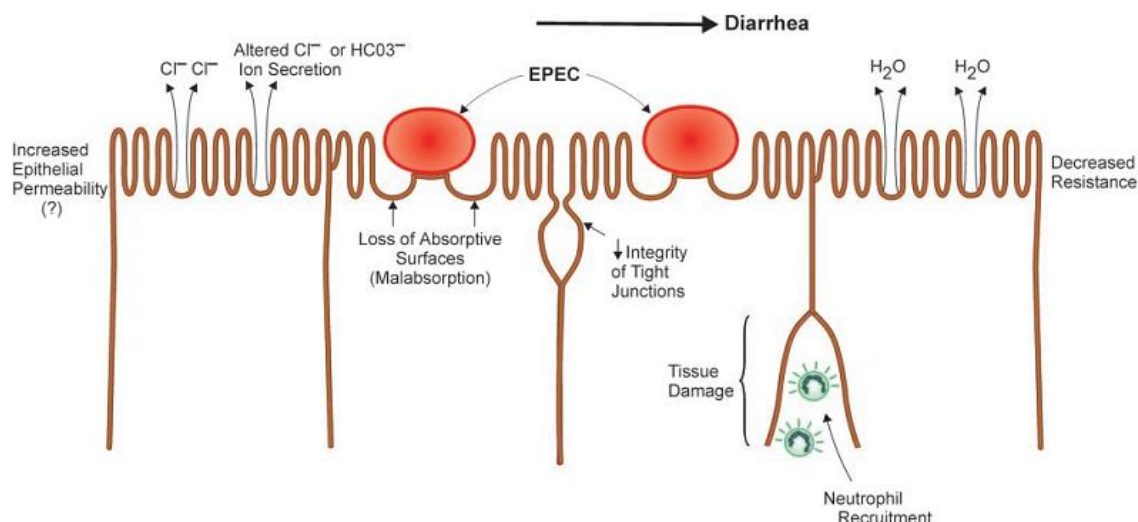
شکل ۱-۹. نحوه ایجاد یک ضایعه ی پدالی به واسطه EPEC [۷۴].

فاکتورهای ویروالانس دیگر EPEC که در خارج از LEE کد می شوند نیز مشخص شده اند. یک پروتئین بسیار بزرگ تقریباً ۳۸۵KD بنام LifA فعال شدن لنفوسیت ها را مهار می نماید [۵۲]. این پروتئین هم چنین در سویه های EHEC بنام Efa1 وجود دارد که عمل اتصالی دارد [۵۳]. سویه های آتپیک EPEC یک پلاسمید 70-100 Kb دارند بنام EAF^{۱۲۵} [۵۴] که این پلاسمید پیلی تیپ ۴ را بنام پیلی ایجادکننده ی دسته^{۱۲۶} کد می کند، که واسطه ی اتصال باکتریایی و احتمالاً اتصال به سلول های اپی تلایال می باشد. پلاسمید هم چنین دارای لوکوس *per*^{۱۲۷} می باشد که محصولات آن اپرون *bfp* و اکثر ژن های LEE را توسط تنظیم کننده ی کد شونده توسط *LeR*^{۱۲۸} تنظیم می نمایند. هم چنین سویه های آتپیک EPEC دارای LEE هستند اما فاقد پلاسمید اند. در کشورهای صنعتی اغلب موارد EPEC آتپیک از افراد اسهالی جدا می شوند و این نسبت بیشتر از اسهال های تیپیکی است که دارای پلاسمید EAF اند، با این وجود EPEC آتپیک در کشورهای در حال توسعه غالب است. EPEC آتپیک هم چنین باعث شیوع های

^{۱۲۵} EPEC adherence factor
^{۱۲۶} Bundle Forming Pilli (Bfp)
^{۱۲۷} plasmid-encoded regulator
^{۱۲۸} LEE-encoded regulator (Ler)

ناگهانی بیماری اسهالی در کودکان و بزرگسالان در کشورهای غیر صنعتی می شود [۷۸-۸۰]. مدل بیماریزایی EPEC خیلی پیچیده تر از اتصال ساده به سلول های اپی تلیال توسط یک ادهسین واحد و ترشح انتروتوکسین است که باعث القاء اسهال می گردد. الگوی جدید بیماریزایی EPEC که چندین جنبه ی آن در بعضی مقالات اشاره شده [۸۱] عنوان می کند که EPEC در ابتدا به سلول های اپی تلیال توسط ادهسین اتصال پیدا می کند که هویت همه ی آن ها هنوز مشخص نشده است اما نماینده ی بالقوه ی آن ها، Bfp، EspA^{۱۲۹}، فلاژله، LifA/EFa1 و ایتیمین، توسط رسپتور سلول میزبان است. تیپ سوم سیستم ترشحی سبس فعال شده و پروتئین های افکتور گوناگونی مانند Tir، EspF، EspG، EspH و Map را به درون سلول میزبان منتقل می کنند. EPEC با استفاده از ایتیمین به غشا اتصال پیدا کرده و تعداد فراوانی پروتئین های اسکلت سلولی زیر باکتری اتصال یافته تجمع می یابند. پروتئین کیناز C (PKC)، فسفولیپاز C، میوزین زنجیره ی سبک کیناز و پروتئین کیناز فعال شده ی میتوزن^{۱۳۰} فعال می شوند که چندین اثر دارند که از آن جمله افزایش نفوذ پذیری در نتیجه ی باز شدن اتصالات محکم است. فاکتور هسته ایی^{۱۳۱} kB فعال می شود و منجر به تولید IL-1 و پاسخ التهابی می گردد که باعث مهاجرت لکوسیت های پلی مورفونوکلئار (PMNs) به سطح لومن و فعال شدن رسپتور آدنوزین می شود. تنظیم رسپتور گالانین ۱ افزایش یافته و از آن رو پاسخ سلول های اپی تلیال به نوروپپتید گالانین زیاد شده که میانجی مهمی در ترشح روده ایی است. برخی و نه همه ی سویه های تیپیک EPEC یک انتروتوکسین به نام EspC تولید می نمایند. اسهال احتمالا^{۱۳۱} در نتیجه ی چندین مکانیسم است که شامل ترشح فعال یون، افزایش نفوذ پذیری روده ایی، التهاب روده ایی و ازدست رفتن سطوح جذبی در نتیجه ی تخریب میکروویلی ها به وجود می آیند [۸۲-۸۳].

^{۱۲۹} EPEC secretion protein A
^{۱۳۰} mitogen-activated protein (MAP)
^{۱۳۱} Nuclear factor (NF)-kB



شکل ۱-۱۰. مکانیسم ایجاد اسهال به واسطه EPEC [۸۴].

۱-۱۱-۱-۶ تفاوت سویه های EPEC تیپیک^{۱۳۲} و آتیپیک^{۱۳۳}

به صورت سنتی EPEC از لحاظ اپیدمیولوژیکی سروتایپ هایی از *E. coli* هستند که باعث ایجاد اسهال در کودکان می گردند. با این وجود امروزه سویه هایی از EPEC وجود دارند که تنوع سروتایپی بسیار زیادی دارند و در گروه هایی قرار می گیرند که غیر قابل کلاس بندی هستند. همچنین سویه هایی از *E. coli* وابسته به سروگروه هایی از EPEC کلاسیک می توانند خصوصیات بیماریزایی را بدست بیاورند که به EPEC شباهت ندارد اما مشابه بقیه *E. coli* های ایجاد کننده ی اسهال است. بنابراین برای شناسایی EPEC باید روش های فنوتیپی و ژنوتیپی براساس حضور یا عدم حضور فاکتور های ویروالانس مهم استفاده گردند. روش های فنوتیپی که برای تفریق سویه های tEPEC از سویه های aEPEC استفاده می شوند شامل تشخیص الگوی اتصال موضعی^{۱۳۴} به سلول های HEp-2 و HeLa است که سویه های EPEC به واسطه داشتن Bfp در طول مدت ۳ ساعت این اتصال را برقرار می کنند در حالیکه سویه های

^{۱۳۲} Typical EPEC (tEPEC)
^{۱۳۳} Atypical EPEC (aEPEC)
^{۱۳۴} Localized adherence

aEPEC به علت عدم حضور آن اتصالی تحت عنوان اتصال شبه موضعی^{۱۳۵} در طول مدت ۶ ساعت با این سلول ها ایجاد می کنند. دیگر روش اثبات حضور Bfp با روش های ایمنولوژیک است. روش های ژنتیکی نیز شامل PCR و Multiplex PCR و استفاده از پروب های ژنتیکی برای یافتن پلاسمید EAF، ژن *bfpA* (که زیر واحد اصلی پیلین Bfp را کد می کند) و ژن *aeae*^{۱۳۶} و یا بقیه ژن های حفظ شده در LEE است. سویه های EPEC به واسطه حضور جزیره بیماریزایی LEE و عدم حضور ژن های *stx* از سویه های EHEC متمایز می گردند. همچنین سویه های tEPEC و aEPEC به واسطه حضور پلاسمید EAF و یا ژن *bfpA* از یکدیگر متمایز می گردند. به صورتی که سویه های دارای این عوامل tEPEC و سویه های فاقد آن ها aEPEC در نظر گرفته می شوند. با این حال برخی سویه های aEPEC مثل سروتایپ های O128:H2 و O119:H2 با پروب BfpA حتی در عدم حضور pEAF واقعی واکنش می دهند. ولی در عوض این سویه ها یک پلاسمید بزرگ دارند که اپرون *bfp* آنها دارای نقص است و Bfp را تولید نمی کند و به همین علت در گروه aEPEC قرار می گیرند. بر خلاف این حالت بعضی سویه ها مثل سروتایپ O142:H6 با پروب EAF واکنش نمی دهند ولی Bfp را تولید می کنند که این سویه ها احتمالاً یک پلاسمید EAF ناقص دارند که هنوز دارای عملکرد است و بنابر این جزء tEPEC ها قرار می گیرند. براساس این یافته ها Trabulsi و همکارانش پیشنهاد دادند که بهترین صفت تفریق کننده ی tEPEC و aEPEC باید بر اساس به ترتیب تولید یا عدم تولید Bfp صورت بگیرد. همچنین در ادامه باید برای اثبات بیماریزایی یک سویه aEPEC توانایی تولید زخم ^{۱۳۷}A/E بر روی سلول های اپی تلیال مورد آزمایش قرار گیرد که متأسفانه استفاده از چنین روش هایی در آزمایشگاه ها محدودیت دارد [۷۹].

^{۱۳۵} Loose localized adherence (LAL)

^{۱۳۶} Enterocyte attachment & effacement
^{۱۳۷} Attaching and effacing lesion

با تمامی این توصیفات این مساله نیز مورد اهمیت است که گاهی در افرادی که اسهال خونی دارند سویه

های aEPEC جداسازی می شوند که ممکن است EHEC هایی باشند که فاقد *stx* می باشند [۸۰].

جدول ۱-۳. خصوصیات سویه های tEPEC و aEPEC [۸۵].

Characteristic	tEPEC	aEPEC
A/E lesion formation	+	+
<i>stx</i> genes	—	—
EAF probe sequence	+	—
<i>bfpA</i>	+	— / + *
BFP expression	+	—
Adherence pattern [†]	LA	LAL/DA/AA/LA [‡] /NA

*Incomplete *bfp* operon (Bortolini et al., 1999).

[†]Adherence pattern in HeLa/HEp-2 cell: LA, localized adherence; LAL, LA like; DA, diffuse adherence; AA, aggregative adherence; NA, nonadherent.

[‡]The LA phenotype in aEPEC strains is independent of BFP expression.

۱-۱۱-۱-۶-۲ عملکرد LEE و ارگانسیم های دارای LEE:

LEE اولین بار در EPEC شناسایی شد که منجر به اسهال در نوزادان و کودکان کم سن در دنیا به

خصوص کشورهای درحال پیشرفت می شود. در EPEC، LEE نقش حیاتی در بیان ویروالانس کامل آن

دارد. این سویه ها تنها از انسان ها جدا نمی شوند بلکه گونه های انسانی متفاوتی نیز وجود دارد که توسط

واریانت های پاتوژن های اسهالی بطور موفقیت آمیزی آلوده شده اند. EPEC در گوساله، خرگوش، سگ،

خوک و نشخوار کنندگان نیز بیماریزا هستند. در کنار LEE، EPEC های تیپیک ویژگی های ویروالانس

دیگری مانند پیلی تشکیل دهنده ی دسته (Bfp) کد شونده به واسطه ی پلاسمید هم وجود دارد. اخیراً

" نشان داده شده که LEE در بسیاری EHEC ها نیز وجود دارد. این سویه ها پاتوژن های منتقل شونده

به واسطه ی غذای مهمی در دنیا به ویژه در کشورهای صنعتی اند. EHEC می تواند اسهال خونی و

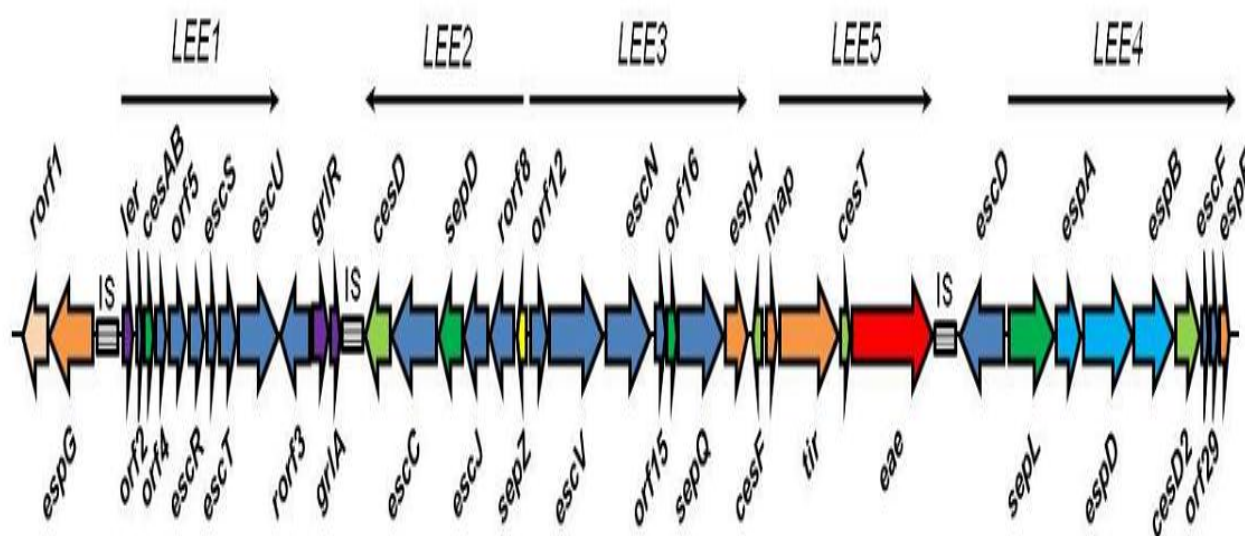
سندرم همولیتیک اورمی ایجاد نماید و مسئول ایجاد اسهال در گوساله ها شناخته شده اند. در حالیکه سروتیپ O157:H7 در EHEC به عنوان شایع ترین سویه ها در سراسر دنیا محسوب می شوند اما طیف کلی سروتیپ های EHEC بسیار متنوع است. بسیاری سروتیپ های EHEC در نشخوارکنندگان یافت شده اند که مخزن عمده ی عفونت انسانی در عفونت های زئونوز می باشد. علاوه برآن اخیراً یک LEE عملکردی درپاتوتیپ دیگری از *E. coli* و در DAEC شناسایی شده است. ضمناً LEE در سایر باکتری ها مانند اشریشیا آلبرتی^{۱۳۸} و سیتروباکتر رودنتیوم^{۱۳۹} دیده شده است. در سیتروباکتر رودنتیوم که عامل هایپرپلازی^{۱۴۰} قابل انتقال روده ایی در جوندگان است نقش ژن مهم *eae* کروموزومی و بنابراین LEE در ایجاد ویرولانسی در عفونت با آزمایش های موتانت ایزوژنی^{۱۴۱} نشان داده شده است. اشریشیا آلبرتی در چند سال گذشته از کودکان اسهالی در محدوده های مشخصی از بنگلادش جداشده است اما نقش دقیق LEE در بیماریزایی هنوز مشخص نشده است [۸۶].

۱-۱۱-۱-۳ سازماندهی ژنتیکی جزایر بیماریزایی LEE

تشکیل ضایعه A/E نیازمند بیان هم زمان ژن های جزایر بیماریزایی LEE است. جزایر بیماریزایی LEE در EPEC برای تشکیل لزیون های A/E لازم و کافی است [۸۷-۸۸]. علیرغم تفاوت هایی در اندازه و محتوای ژنتیکی پاتوژن های دارای A/E جزایر بیماریزایی LEE دارای یک ساختار پایه ایی ثابت می باشد. این جزایر حاوی ۴۱ ژن است که به طور عمده در ۵ اپرون پلی سیسترونیک: LEE1، LEE2، LEE3، LEE4 و LEE5 و ۲ اپرون بی سیسترونیک: *rorf1-espG* و *grlRA* و ۴ اپرون منوسیسترونیک: *map*، *cesF*، *rorf3* و *escD* سازماندهی شده اند. اپرون های LEE1، LEE2 و LEE3 تیپ سوم سیستم ترشحی را کد می نمایند که برای انتقال پروتئین باکتری به درون انتروسیت ها

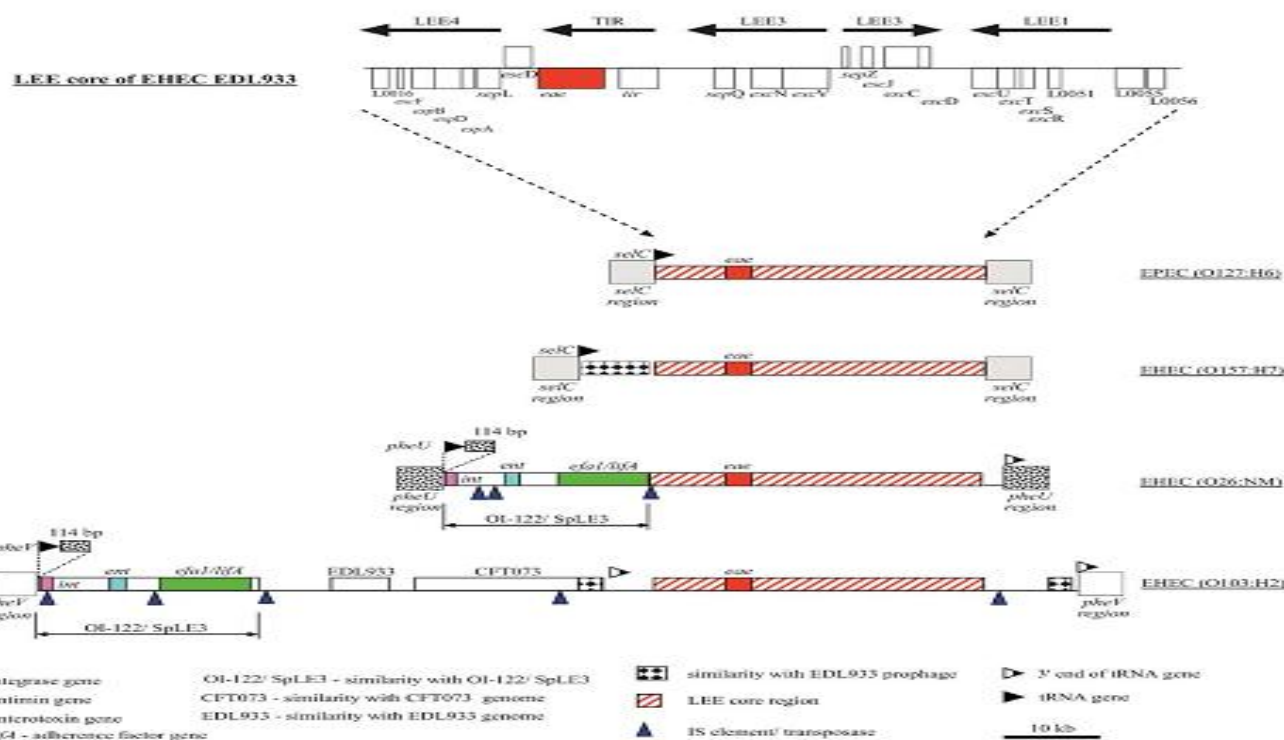
^{۱۳۸} *Escherichia albertii*
^{۱۳۹} *citrobacter rodentium*
^{۱۴۰} hyperplasia
^{۱۴۱} Isogenic mutant

ضروری است [۸۹ و ۳۳]. LEE4 حاوی ژن های esp^{142} (پروتئین های ترشحی EPEC) است و $espADB$ پروتئین های انتقالی را کد می کند که کانالی را تشکیل می دهند که از خلال آن پروتئین های افکتوری تیپ سوم سیستم ترشحی به درون سلول میزبان منتقل می شود [۷۶]. ژن های لازم برای اتصال باکتری به سلول میزبان در LEE5 جای گرفته اند: ژن eae کد کننده ی آدهسین های ایتیمین و Tir می باشد و $cesT$ نیز چاپرون Tir را بیان می نماید [۹۰ و ۷۶]. اولین ژنی که در LEE1 کد می شود ler می باشد که تنظیم کننده ی اصلی جزایر بیماریزایی LEE است. در کنار ler سایر پروتئین های تنظیمی در جزایر بیماریزایی LEE بیان می شوند که شامل: GrIR (که مانند تنظیم گرم منفی عمل می نماید) و GrIA (یک تنظیم کننده ی مثبت) است. ژن های بیان کننده ی آن دسته پروتئین ها در اپرون $grlRA$ سازمان دهی شده اند [۹۱-۹۲]. سایر ژن های کد کننده ی چاپرون ها و پروتئین های افکتوری مسئول انهدام مسیرهای میزبان در طول جزایر بیماریزایی LEE و هم چنین پروفاژها و سایر جزایر بیماریزایی پاتوژن هایی که دارای A/E در کروموزوم خود می باشند قرار گرفته است [۸۶]. بررسی توالی درجات زیادی از حفظ شدگی در ژن های کد کننده ی T3SS بروز می دهند اما در ژن های کد کننده ی ایتیمین و ژن های بیان کننده ی پروتئین های ترشحی شباهت کمتری را از نظر توالی نشان می دهند. این حالت توسط تعامل پروتئین های کد شونده با میزبان توجیه می شود که باعث افزایش فشار انتخابی در این ژن ها می گردد. ساختار جالب توجه ی هسته ی LEE پایین بودن محتوای G+C است که ۳۸٪ بوده که به انتقال ژن از گونه های مرتبط دورتر اشاره دارد [۸۶].



شکل ۱-۱۱. اپرون ها و ژن های موجود روی LEE در سویه E2348/69 [۹۳]

اخیرا LEE در EHEC RW1374 (O103:H2 گاوی) شناسایی شده که محدوده ای بیش از 111 kb را اشغال می نماید که این LEE در ژن tRNA ی دیگری به نام *pheV* وارد شده است. در کنار هسته ی LEE این PAI دارای یک همولوگ OI-122 یا SpLE3 و همچنین توالی های کوتاه *E. coli* K12 و ژن هایی است که در هیچ پایگاه اطلاعاتی مشابه ان نیامده است (شکل ۱-۱۱). به طور کل ۳ نوع LEE بر اساس سایت ورودیشان وجود دارند: *selC* و *pheU* و *pheV* در حالی که هسته ی LEE در تمام PAI ها یک اندازه ی محافظت شده ی 34 kb را اشغال می کنند اما توالی های مجاور آن به طور برجسته ای با هم فرق دارند که ممکن است دارای ژن هایی با عملکرد های ناشناخته مانند *efa-ent* و *lifa* باشند. همچنین LEE های وارد شده به *pheU* و *pheV* نسبت به *selC* شباهت بیشتری به همدیگر دارند. این یافته ها تکامل LEE را مورد سوال قرار می دهند که کدام LEE در PAI خارجی برای اولین بار وارد ژنوم *E. coli* شده و این اتفاق چند بار تکرار شده است [۸۶].



شکل ۱-۱۲. نمایی از تفاوت LEE در سوبه های EPEC و EHEC با سروتایپ های مختلف [۸۶].

۱-۱۱-۶-۴ الگوی تشکیل لزیون های A/E

ایجاد ضایعه های A/E شامل ۳ مرحله است: (۱) اتصال موضعی (۲) سیگنال ترانسداکشن (۳) اتصال محکم.

Kaper و Donnenberg این الگو را در EPEC در سال ۱۹۹۲ ارائه دادند [۹۶ و ۸۷].

اتصال موضعی: این مرحله برای فرایند های سیگنالی منتهی به تشکیل ضایعه های A/E لازم است. EPEC پلاسمید EAF (فاکتور اتصال EPEC) را در خود جای می دهد [۶۵-۶۶]. در این پلاسمید اپرون *bfp* قرار دارد که تیپ چهارم پیلی تشکیل دهنده ی دسته را بیان می نماید که مسئول تجمع باکتریایی و تشکیل میکروکلونی هایی است که قدرت اتصال به سلول های اپی تلیال روده ای را به EPEC می دهد. با این وجود EHEC و سیتروباکتر رودنتیوم هیچ کدام از پلاسمید EAF و پیلی Bfp را ندارند. گزارش شده است که برخی پروتئین های کد شده در جزیره بیماریزایی LEE قادر به افزایش اتصال باکتری به سلول میزبان می

باشند [۹۵-۹۴]. یکی از این پروتئین ها EspA است که ساختارهای فیلامنتی تشکیل می دهد که در توسعه ی تیپ سوم سیستم ترشحی در پاتوتایپ های دارای A/E نقش دارد. فیلامنت های EspA در تشکیل مراحل اولیه ی لزیون های A/E لازم است زیرا نقش اتصال به آن نسبت داده شده است. علاوه بر آن در غیاب Bfp (در سویه های آتپیک EPEC) EspA به درجاتی کمتر از Bfp ارتباط اولیه را به سلول میزبان را برقرار می سازد [۹۶ و ۸۷].

سیگنال ترانسداکشن : هنگامیکه باکتری به سطح سلول های اپی تلایالی متصل می گردد تغییر در مسیرهای سیگنال ترانسداکشن یوکاریوتی القا می گردد. پروتئین های مسئول این عمل افکتور نامیده می شوند و به طور عمده در جزایر بیماریزایی LEE کد می شوند. پروتئین های افکتوری مانند: EspF, EspH, EspG, EspZ, Tir, Map, EspB به درون سلول های اپی تلایال از طریق تیپ سوم سیستم ترشحی تزریق می شوند. با این وجود پروتئین هایی وجود دارند که خارج جزیره بیماریزایی LEE کد می شوند ولی از طریق این سیستم ترشحی ترشح می گردند. مانند: Cif, EspI/NleA, EspJ, EspFu [۹۶].

اثرات القا شده توسط پروتئین های افکتور منجر به تشکیل ضایعه های A/E و متعاقب آن تخریب میکروویلی ها در منطقه ی اتصال و سازماندهی مجدد اکترین و در نهایت تشکیل پدال ها می شود. این چنین ساختارهایی این مزیت را به پاتوژن های A/E می دهد که به عنوان باکتری خارج سلولی باقی مانده و موجب اسهال گردند [۸۷].

عواقب عفونت های پاتوژن های A/E در سلول های یوکاریوتی شامل:

- (۱) تغییر در عملکرد سد دفاعی روده و افزایش نفوذپذیری در اتصالات محکم. (۲) از دست رفتن عملکرد غشای میتوکندری. (۳) مهار سیکل سلولی در فاز گذرای G2/M. (۴) القای آپوپتوز سلولی [۸۴].

اتصال محکم: اتصال محکم بستگی به پروتئین غشای خارجی باکتری یعنی اینتیمین و Tir که رسپتور پروتئینی اینتیمین است دارد که به سلول یوکاریوتی منتقل شده و در غشای پلاسمایی جای گرفته است. اینتیمین علاوه بر تعامل با Tir گفته می شود با رسپتورهای سلول یوکاریوتی مانند $\beta 1$ - ایتگرین ها^{۱۴۳} و نوکلئولین^{۱۴۴} واکنش می دهد [۹۷ و ۸۷].

این مورد مثال فوق العاده ای از یک پاتوژن می باشد که رسپتور خود را فراهم می کند تا از اتصال موفق به سلول میزبان مطمئن گردد [۷۴].

۱-۱۱-۱-۶-۵ مولکول های تاثیر کننده سیستم ترشعی تیپ

سیستم های ترشعی، از ابزارهای مورد نیاز در بیماری باکتری هستند. چون، امکان انتقال پروتئین ها و دیگر مولکول های تولید شده در باکتری ها به سلول میزبان را فراهم می سازند. پنج نوع سیستم ترشعی، عمدتاً بر اساس پروتئین های تشکیل دهنده آنها شناخته شده اند. نوع اول تقریباً در همه باکتری های بیماریزای وجود داشته و ترشح توکسین هایی مانند همولایزین و... عهده دار است. و در ورود و صدور انواعی از ترکیبات به سیستم کمک انرژی تأمین شده از راه هیدرولیز ATP، فعالیت می کنند. سیستم نوع دوم، به طور معمول در باکتری های گرم منفی وجود داشته و در ترشح پروتئین های مختلف، آنزیم ها، توکسین ها و ... نقش دارد [۸۵].

جدول ۱-۴ انواع تیپ های سیستم ترشحي [۸۵].

مثال ها	خصوصیات	سیستم ترشحي
آلفاهمولیزین <i>E.coli</i> آدنیلآت سیکلاز در بردتلا پرتوزیس	عبور پروتئین های ترشحي در یک مرحله از غشاء داخلی و خارجی انجام می گیرد. (بدون واسطه ی پری پلاسمی) این نوع ترشح نیاز به ۳ پروتئین دارد: ۱- AT Pase که در غشاء داخلی است. ۲- پروتئین در غشاء خارجی ۳- پروتئین فیوژن که فضای پری پلاسمیک را در بر می گیرد. اطلاعات درون ۶۰ اسید آمینه انتهایی در COOH قرار می گیرد. این مسیر وابسته به سیستم ترشحي و پروسه آمینوترمینال نیست.	تیپ یک (I)
الاستاز، فسفولیپاز C و اگزوتوکسین A در سودوموناس ترشح پولولاناز pululanase در کلبسیلا اکسی توکا	عبور پروتئین ها در دو مرحله انجام می شود. این پروتئین ها به صورت پیش پروتئین ساخته شده و دارای سکانس سیگنال یا راهنما در انتهای آمینی خود حاوی ۴۰-۱۵ اسیدآمینه هستند. این پروتئین در حین عبور از غشاء داخلی نیاز به سیستم SEC دارند. عده ای از این پروتئین های غشاء داخلی مانند (sec D,F,Y) و ATP از آن که Sec A است. Sec B نقش چاپرون را دارد که به سیگنال پپتیداز و پروپروتئین اتصال یافته و بعد از انتقال قطعه اضافی، توسط پپتیداز جدا شده (LSPA) و پروتئین کامل به درون فضای پری پلاسمیک آزاد می شود. در غشاء خارجی پروتئین هایی هستند که باعث انتقال به خارج سلول می شود. مسیر tat در باکتری های گرم منفی و مثبت جهت انتقال پروتئین ها از خلال غشا نقش دارد. در باکتری های گرم منفی این سیستم پروتئین های را به سیستم ترشحي ۲ تحویل می دهد تفاوت این سیستم از سیستم sec در این است که tat تنها پروتئین های چین خورده را انتقال می دهد.	تیپ دو (II)
ترشح yop در یرسینیا و بیشتر آنتروباکتریاسه ها	تیپ ۳ مانند تیپ ۱ بوده ولی پروتئین غشاء داخلی تا غشاء خارجی کشیده شده و در آنجا به پروتئین دیگری متصل می شود. مانند مسیر یک وابسته به سیستم ترشحي نیست و در یک مرحله پروتئین ترشحي از غشاء داخلی و خارجی ترشح می شود.	تیپ سه (III)
ترشح پرتوزیس توسط بردتلا پرتوزیس عامل محرک IL8 توسط هلیکوباکتریپیلوری ترشح کمپلکسپروتئین - DNA توسط آکروباکتریوم تومفاسینت	این مسیر ترشح توکسین های باکتریایی را بین سلول باکتریایی یا بین باکتری و سلول یوکاریوتی ترشح می کند. این سیستم، مجموع DNA - پروتئین را نیز ترشح می کند.	تیپ چهار (IV)
IgA پروتئین نایسریا گونوره تولید سیتوتوکسین واکوئله کننده Vacuolating در هلیکوباکتریپیلوری	این تیپ ترشح مانند تیپ II بوده و پروتئین ترشحي طی دو مرحله ترشح می شود.	تیپ پنج (V)
سودوموناس	این سیستم اخیراً در سودوموناس یافت شده است که و غیر وابسته به Sec است و در بیمارانی مبتلا به فیبروزکیستیک نقش دارد. این سیستم ۱۵ تا ۲۰ پروتئین دارد که برخی از این پروتئین ها مشابه پروتئین های دم باکتریوفاژها هستند.	تیپ شش VI

مولکول های تاثیر کننده سیستم ترشحی تیپ III، ایتیمین که توسط ژن *attaching & effacing (eae)* در *E.coli* کد می شود برای اتصال محکم و بازچینی اسکلت سلولی لازم است. اسید امینه ی متغیر ۲۸۰ انتهای کربوکسیلی ایتیمین (Int280) تعیین کننده ی زیرگروه های ایتیمین است. ارتباط میان بیان برخی زیر گروه های ایتیمین و تمایل بافتی در شرایط *Invitro* نشان داده شده است. با وجودیکه انتشار بافت میزبانی سویه های EPEC احتمالاً چند فاکتوری است اما مشخص کردن زیر گروه های مختلف ایتیمین اطلاعاتی درباره ی تمایل بافتی آن ها فراهم می آورد. زیر گروه های ایتیمین α , β , ϵ , γ , δ و κ به عنوان شایع ترین زیر گروه ها در سویه های مختلف EPEC های اتیپیک (aEPEC) در سروتایپ های متفاوت در جهان محسوب می شوند و سایر زیر گروه های ایتیمین کمتر شایع اند. نشان داده شده است که سویه های aEPEC که از یک منطقه جغرافیایی جدا شده اند یک زیر گروه از ایتیمین را حمل می کنند. برای مثال O51:H40 aEPEC جدا شده از برزیل، اروگوئه و اسپانیا دارای ایتیمین γ می باشند. در مقابل بعضی سروتایپ ها زیر گروه های متفاوتی را به صورت همزمان حمل می کنند. برای مثال O80:H26 هر دو نوع ایتیمین زیر گروه β و ϵ را با هم دارد. بروز سروتایپ واحدی از سویه های aEPEC حمل کننده ی زیر گروه های متفاوت از ایتیمین تنوع سویه ها را اثبات نموده است و این نظریه که LEE می تواند در زمان های مختلف توسط سویه های متفاوتی کسب می شود را اثبات می کند [۸۵].

Tir ۶-۶-۱-۱۱-۱

ورود پروتئین رسپتور انتقالی ایتیمین (Tir) به درون غشای سلول میزبان به باکتری اجازه می دهد که از طریق ایتیمین با Tir قرار گرفته روی غشا، اتصال متقاطع بدهد. Tir پس از ورود از طریق سیستم

ترشحي تپ III طوري در غشا قرار مي گيرد كه از ۳ دوميني^{۱۴۵} كه تشكيل مي دهد اولي و سومي به صورت داخل سلولي در سيتوپلاسم مستقر مي شوند و دومين دومي به صورت خارج سلولي براي اتصال ايتيمين قرار مي گيرد. ورود Tir همچنين باعث تعامل بين دومين هاي داخلي اش با پروتين هاي سلول ميزبان مي گردد كه در تشكيل Pedestal اهميت دارد. با وجود اين كه نقش تشكيل اين Pedestal ها به خوبي مشخص نشده است ولي موتانت هايي كه فاقد توانايي ايجاد ان هستند ويرولانسان ان ها به شدت كاهش يافته است [۹۸].

۱-۱۱-۶-۷ پروتين هاي ترشحي EPEC^{۱۴۶}

علاوه بر Tir منطقه هسته اي حفاظت شده LEE ۷ افكتور پروتين ديگر توليد مي كند (EspD , Map , EspF , EspG , EspH , EspA , EspB). بسياري از پاتوژن هاي حيواني و گياهي از سيستم ترشحي تپ III براي ترشح فاكور هاي ويرولانسان كليدي خود استفاده مي كنند كه برخي از آن ها مستقيماً از سيتوپلاسم پاتوژن به سيتوزول سلول ميزبان تزريق مي شوند. EPEC و EHEC از سيستم ترشحي تپ III LEE استفاده مي كنند تا چندين پروتين ترشحي كد شده توسط آن را ترشح كنند. ترشح Esp ها براي سيگنال ترانسداكشن در سلول ميزبان و تشكيل لزيون هاي A/E ضروري است. ترشح Esp وقتي القا مي شود كه باكتري در كشت سلول يوكاريوتي در شرايط مشابه به ان چه در دستگاه گوارش يافت مي شود، رشد مي كند. مطالعات اخير ابعاد جديدي از فعاليت هاي غير قابل پيش بيني Esp ها را فراهم نموده است. يكي از اين يافته ها مشاهده اين مطلب است كه EspA ان چنان كه قبلاً تصور مي شده است، يك پروتين در گير در سيگنالينگ سلول ميزباني نيست، بلكه پروتين ساختماني است كه جزء اصلي فيلامنت بزرگي مي باشد كه به طور موقت بر روي سطح باكتري حضور مي يابد و با سلول

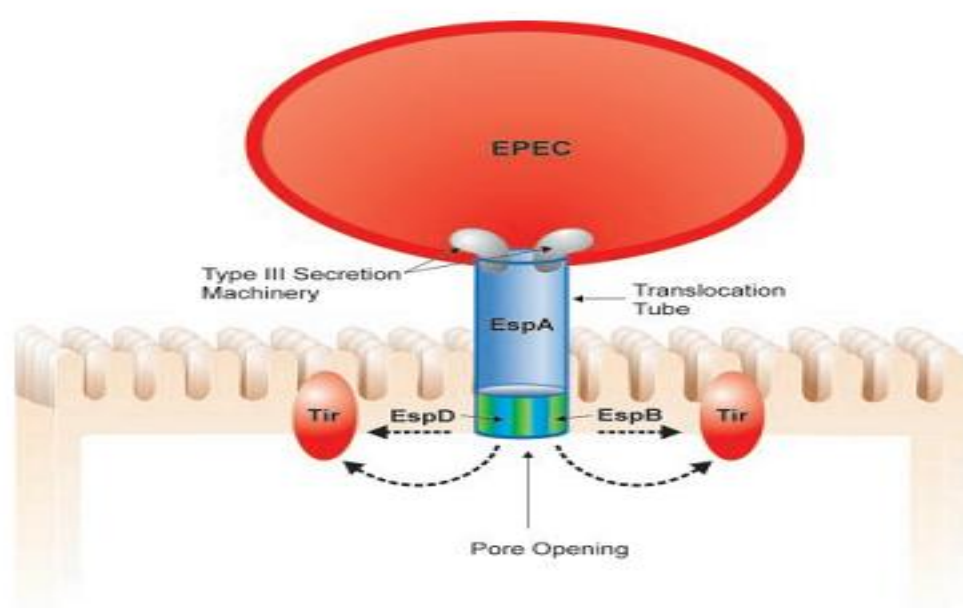
^{۱۴۵} domain
^{۱۴۶} EPEC secretion proteins(Esp)

میزبان در طول فاز اولیه تشکیل لزیون های A/E اتصال ایجاد می نماید. در اثر این اتصال فیلامنت های EspA باعث اتصال اولیه باکتری به سلول میزبان می گردند اما مهم تر این که باعث انتقال EspB و Tir میگردند. هر فیلامنت تقریباً 50nm قطر و 2mm طول دارد که از ساختار های شبیه فیمبریه با قطر تقریبی 7nm تشکیل شده است که به صورت ساختار سیلندری شکل یافته اند. از این رو فیلامنت های EspA دارای ساختار های سیلندری تو خالی می باشند که می توانند کانالی را تشکیل دهند که از خلال آن پروتئین ها به درون سلول میزبان منتقل گردند. EspD که هنوز عملکرد آن نا مشخص مانده است نیز می تواند جزئی از فیلامنت های EspA باشد. زیرا یک موتانت EspD یافت شده که سطوح پایینی از EspA ترشح می کنند و بندرت فیلامنت های قابل تشخیصی تولید می نمایند. اخیراً گزارش شده است که EspA می تواند دارای دومین های پیچ در پیچی باشد. این نشان می دهد که گرد هم ایی فیلامنت EspA شامل تعامل حلقه-حلقه میان هلیکس های متفاوتی از زیر واحد ها باشد. اگر چه این حالت در سیستم ترشحی تیپ III فراوان است ولی دومین های حلقه-حلقه مهم در میان کنش پروتئین-پروتئین فقط در YopN^{۴۷} به صورت تجربی تعریف شده است. EspB جزئی از ساختار فیلامنتی EspA نیست زیرا انتی سرم ساخته شده علیه ان به فیلامنت EspA متصل نشده است و موتانت های EspB هنوز فیلامنت های نرمال EspA را تولید می نمایند. در عوض با استفاده از ایمونوفلورسانس، ایمونوبات سلول های میزبان و سیستم گزارشگر ادنیلات سیکلاز وابسته به کالمودولین نشان داده که پس از اتصال باکتری EspB به درون سلول میزبان انتقال داده شده و در هر دوی غشا و سیتوزول منتشر شده و همین طور نشان داده که فیلامنت های EspA برای انتقال EspB ضروری هستند. علاوه بر آن با تماس با سلول های میزبان یک ترشح انفجاری از EspB به وجود می آید که بیان کننده ی این است که در فقدان سلول های اپی تلیال ترشح EspB توسط EPEC احتمالاً در سطح پایین است و در حالتی مشابه حالت ترشح پروتئین توسط

^{۴۷} Yersinia outer membrane protein N

سیستم ترش‌چی تیپ III انجام می‌شود. پس ترشح EspB وابسته به تماس سلولی می‌باشد. البته انتقال EspB به آن وابسته نمی‌باشد اما توسط اتصال اولیه باکتریایی این انتقال نیز افزایش می‌یابد. همچنان که EspB به درون غشا سلول میزبان انتقال می‌یابد به طور ضعیفی شباهت ساختاری به YopB یرسینیا پیدا می‌کند (پروتئینی که مسئول تشکیل کانال انتقالی به غشای سلول میزبان است) امکان دارد که EspB عمل مشابهی را در EPEC انجام دهد. مستقر شدن درون سیتوپلاسم توسط تعدادی از EspB ها ممکن است عملکردهای دیگری نیز داشته باشد. تا کنون اصول ساختاری پروتئین‌های انتقالی در تمامی سیستم‌های ترش‌چی تیپ III به خوبی روشن شده است. EscC یک جزء بزرگ از سیستم ترش‌چی تیپ III EPEC است که در سطح باکتری بیان می‌شود. به تازگی مشخص گردیده است YscC همولوگ EscC در یرسینیا به صورت کمپلکس الیگومری حلقه‌ای شکل در غشای خارجی باکتری وجود دارد که تقریباً 20nm قطر منفذ مرکزی آن است از این رو EscC می‌تواند نوع مهمی از پروتئین‌های تشکیل دهنده ی کانال را در غشای خارجی EPEC بروز دهد. این مطالب نشان دهنده حضور پروتئین‌های تشکیل دهنده منفذ در غشا خارجی باکتری و غشا پلاسمایی سلول میزبان است. این مطلب عنوان می‌کند که حضور پروتئین‌های تشکیل دهنده ی منفذ با منشا باکتریال در هر دوی غشای خارجی باکتری و غشای پلاسمایی سلول عفونی میزبان حضور دارد. با این حال ساختاری که بتواند هر دوی منفذهای غشایی را به هم متصل کرده تا مسیری از سیتوزول باکتری به سیتوزول سلول را فراهم آورد قبلاً توصیف نشده بود. فرض می‌شود که فیلامنت‌های EspA این ارتباط را برای اتصال منفذ غشای باکتری ایجاد شده توسط EspB را به منفذ غشای یوکاریوتی ایجاد شده توسط EspB برقرار می‌کند. البته هنوز بایستی مشخص شود که آیا این جزء منفک از ترانس‌لوکون EPEC، بطور فعال ایتگره می‌شود یا خیر؟ اما اگر ترانس‌لوکون وجود داشته باشد، بایستی مانند یک سرنگ مولکولی عمل نماید که توسط EscN ATPase سیستم ترش‌چی تیپ سوم انرژی خود را به دست آورده و پروتئین‌ها را مستقیماً از باکتری به سیتوزول سلول

میزبان تزریق نماید. جالب است که بدانیم آیا مکانیسم مسئول برای انتقال پروتئین ها در EPEC شبیه سایر پاتوژن هاست که سیستم های ترشحی تیپ III را به کار می گیرند. در این راستا باید متذکر شد که همولوگ های EspA و EspB در سالمونلا وجود دارد و ساختارهای فیلامنتی مشابه به فیلامنت های EspA تولید شده از سیستم ترشحی تیپ III دیگری یعنی HrpA در سودوموناس سینرژیه توصیف شده است [۱۴ و ۷۰].



شکل ۱-۱۳. وارد شدن Tir به داخل سلول به واسطه ی EspA,B,D [۷۴].

EspF نقش مهمی در تخریب عملکرد دفاع روده ایی دارد که برای از دست رفتن مقاومت میان اپی تلیومی، برای افزایش نفوذ پذیری لایه های روده ایی، برای انتشار پروتئین های مرتبط با اتصالات محکم مثل EspF به اوکلودین^{۱۴۸} که در میتوکندری میزبان از طریق انتهای آمینی قرار می گیرد لازم است و مسنول نفوذ پذیری غشای میتوکندریایی می باشد. علاوه بر آن رهاسازی پروتئین سمی سیتوکروم C را به سیتوزول و شکست کاسپاز ۳ و ۹ را القا می نماید که نشان می دهد EspF نقش مهمی در شروع مرگ

^{۱۴۸} OCCLUDIN MITOCONDRI

میتوکندریایی ایفا می نماید [۷۷ و ۹۹]. یک خانواده ی مهم از افکتورهای تیپ III سیستم ترشحی بنام پروتئین های WxxxE اخیراً توصیف شده است که شامل IpgB و IpgB2 از شیگلا، SifA و SifB از سالمونلا و Map، EspM، EspT از EPEC و EHEC. اعضای خانواده ی WxxxE افکتورهای ویروالانس مهمی هستند. پروتئین های مرتبط با میتوکندری، Map که روی جزیره بیماریزایی LEE کد می شود و در میان سویه های EPEC و EHEC محافظت شده هستند نقش مهمی در کلونیزاسیون در شرایط *invivo* ایفا می کند و با فعالسازی RhoA GTPase و Cdc42^{۱۴۹} تشکیل فیلوپوهای موقت را آغاز می کنند. واریانت های متفاوت EspM تشکیل فیبرهای استرس را با فعال کردن RhoA القا می نمایند درحالیکه EspT در سیتروباکتر رودنتیوم تشکیل لاملیپودیای گسترده ایی را با فعال کردن Cdc42 و Rac-1 را تحریک می نمایند [۱۰۰].

E. coli افکتور مشابه را کد می کند EspM 1 و EspM 2 که مسیریگنالی RhoA را فعال نموده و تشکیل فیبرهای استرس را درطول عفونت سلول های میزبانی القامی نماید. EspM تشکیل اکتین های پدالی را مهار می نماید. نشان داده شده که انتقال EspM به درون سلول های اپی تلیال قطبی تغییرات بزرگی را در اتصالات محکم و در مورفولوژی و ساختارسلول های تک لایه ایی قطبی عفونی القا می نماید. این تغییرات با تغییر موضعی اتصالات محکم و مورفولوژی سلول ها ظاهر می شود. جالب توجه آن است که علیرغم تغییرات بزرگ در ساختارسلول ها آن ها همچنان زنده باقی می مانند و تک لایه های اپی تلیالی عملکرد دفاعی نرمال خود را حفظ می نمایند [۱۰۱]. عضوی دیگر از افکتور های خانواده ی WxxxE که مانند EspM در EPEC E110019 وجود دارد EspT است که در سیتروباکتر رودنتیوم نیز کد می شود. EspT به وسیله ی فعال کردن Rac1^{۱۵۰} و Cdc42 تشکیل لاملی پودیا^{۱۵۱} و برآمدگی های غشایی

^{۱۴۹} Cell division control protein 42
^{۱۵۰} Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
^{۱۵۱} Lamellipodia

روی سلول های اپی تلیال را تحریک می کند. بر امدگی غشایی ساختار صفحه ای است که به سلول های پستانداران اجازه پینوسیتوز^{۱۵۲} و بازیافت گیرنده ها را می دهد. گروهی از باکتری های پاتوژن به واسطه ی تغییر در سیگنال ترانسداکشن سلول میزبان ایجاد این ساختار را تحریک می کنند و به واسطه ی آن وارد سلول میزبان می گردند. EspT مانند IpgB1 شیگلا با ایجاد این ساختار ها باعث تهاجم EPEC به سلول میزبان می گردد [۱۰۲].

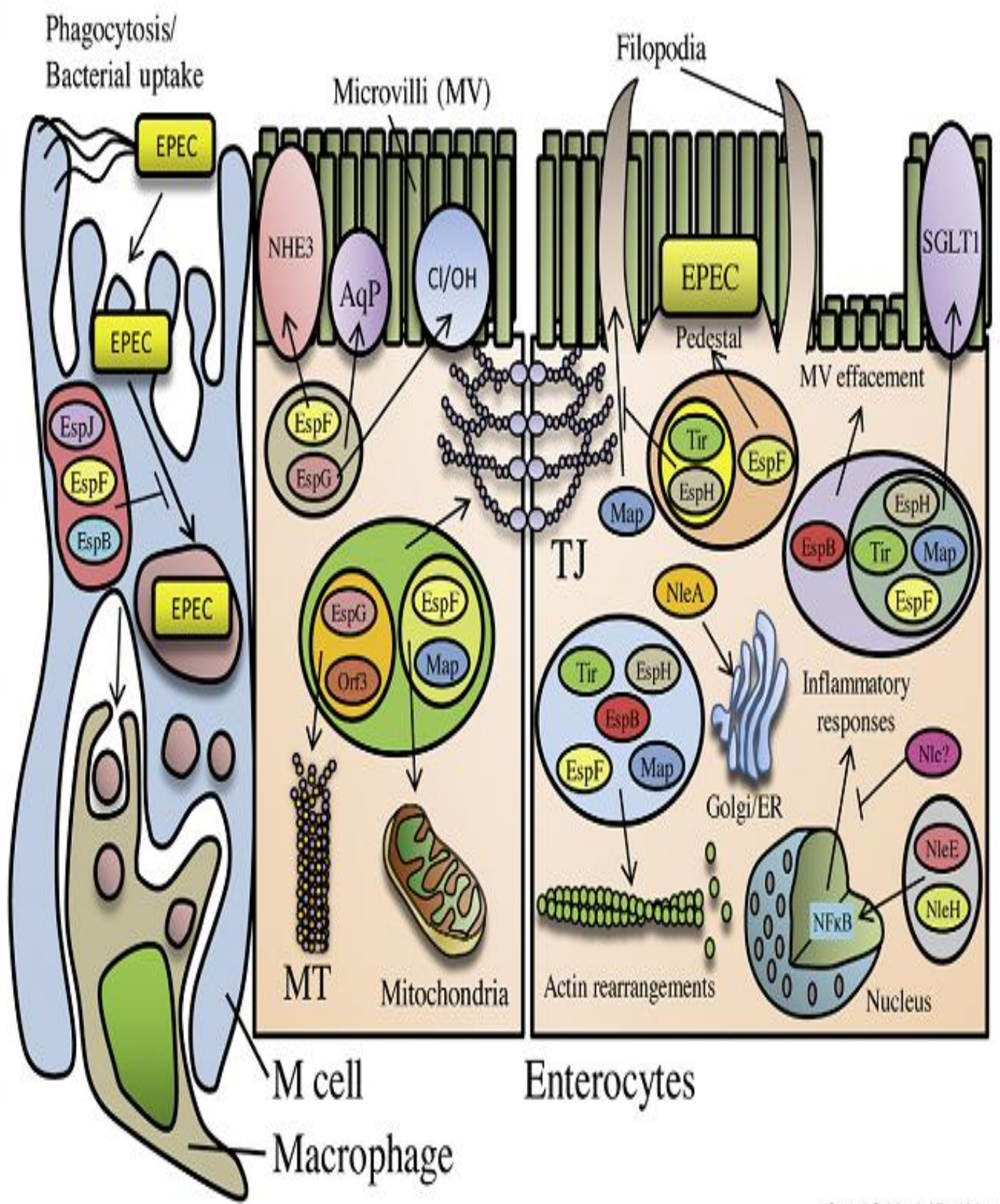
orf19 در LEE که به Map تغییر نام داده است (پروتئین مرتبط با میتوکندری) ۲۰۳ اسید آمینه کد می کند که ۴۴ تای اول آن پیش بینی می شود که به عنوان انتهای آمینی میتوکندریایی و توالی های قطعه قطعه کننده^{۱۵۳} عمل می نمایند. این اشکال می توانند به عنوان جمعیتی از Map عمل کنند که انتهای آمینی آن ها در سلول های میزبان شکسته می شود. اگر این مورد صحیح باشد این مولکول ها احتمالاً "به درون ماتریکس میتوکندری یا فضای بین غشایی وارد می شوند. اما احتمال نمی رود که Map دارای دومین های گسترش دهنده ی غشا باشد. مطالعات عفونت در حضور رنگ فلورسانسی که به طور اختصاصی جذب شده و توسط میتوکندری به مدت طولانی تا وقتی که غشا سالم باشد حفظ می شود، نشان داده شده که Map غشای میتوکندری را تخریب می کند. Map نیز به یک غشا نیاز دارد تا با این ارگانل ها همراهی کند. تخریب میتوکندری القاشده توسط پاتوژن اغلب همراه با شروع با مرگ برنامه ریزی شده ی سلولی و آزاد شدن فاکتورهای پیش آپوپتوزی و متعاقب آن فعالسازی کاسپازهای پروتئولیتیک است. دیگر نقش های ممکن می تواند شامل تعامل میان Map با یا بدون میتوکندری باشد که بتواند سطح تولید ATP مرتبط با میتوکندری را متعادل نموده تا فعالیت آنزیم های حساس به ATP را تغییر داده و شاید سایر فعالیت های تحت کنترل میتوکندری که هنوز شناخته نشده است را به دست بگیرد. همه ی این احتمالات جزء مهم

^{۱۵۲} Pinocytosis
^{۱۵۳} Cleavage sequences

ترین مسائل امروزی است که بتوانند موقعیت Map را در میتوکندری و هم چنین مکانیسم , فعالیت و نقش EPEC را در بیماری نشان دهد [۱۰۳].

واکنش متقاطع میان میکروتوبول ها و اکتین اسکلت سلولی برای تنظیم بسیاری عملکردهای سلولی مانند: مهاجرت, تحرک, تولید سایتوکاین و قطبیت سلولی ضروری است. تنظیم اکتین اسکلت سلولی با میکروتوبول ها بستگی به فعالیت Roh GTPase دارد و ناپایداری و عدم تجمع میکروتوبول ها باعث پیش رفتن تشکیل فیبرهای استرس اکتین می شود. عفونت EPEC در فیرو بلاست ها نشان داده شده که تشکیل فیبرهای استرس اکتینی همراه با تشکیل برجستگی هایی در اطراف سلول میزبان است. افکتورهای EspG و EspG2 (که orf13 نیز نامیده می شوند) نشان داده شده که مسئول واکنش متقاطع میان اکتین اسکلت سلولی و میکروتوبول ها در طی عفونت EPEC است. EspG و EspG2 که مشابه ی افکتور VirA در شیگلا هستند گفته می شود که باعث ناپایداری میکروتوبول ها و فعالسازی Rac 1 می گردند و مستقیماً " با توبولین واکنش داده و شبکه ی میکروتوبولی را زیر باکتری EPEC متصل تخریب می نمایند. EspG و EspG2 که دارای فعالیت های فراوانی هستند وابسته به T3SS بوده اما غیروابسته به واکنش های ایتیمین Tir/ اند. علاوه بر آن هر دوی EspG و EspG2 موتانت VirA شیگلا ها را تکمیل می نمایند. EspG تکمیل کننده ی موتانت VirA تخریب میکروتوبول ها را مشابه تیپ های وحشی EPEC میانجی می کند [۱۰۴].

Orf 18 در LEE , EspH را کد می کند که به درون سلول های عفونی از طریق TTSS انتقال می یابند. در سلول میزبان EspH در غشای سلول لوکالیزه می شوند. EspH تشکیل فیلوپودها را سرکوب نموده و تشکیل پدال های اکتینی را افزایش می دهد. EspH ساختارهای سکلت سلولی میزبان را مستقیم یا غیر مستقیم با مهار سیگنال های Cdc42 متعادل می نمایند [۱۰۵].



شکل ۱-۱۴. نمایی از عملکرد پروتئین های ترشحی EPEC بر روی اجزا سلول میزبان [۱۰۶].

۱-۱۱-۲ عفونت های خارج روده ای :

۱-۱۱-۲-۱ عفونت های مجرای ادراری

انواع عفونت های ادراری براساس تظاهرات بالینی، میزان تهاجم به بافت، شرایط اپیدمیولوژیک، و احتیاج به درمان آنتی بیوتیکی، متفاوت می باشد. ۵ نوع اصلی عفونت ادراری وجود دارد: اورتریت،^{۱۵۴} باکتریوری بدون علامت،^{۱۵۵} عفونت مثانه،^{۱۵۶} سندرم حاد مجرا^{۱۵۷} و پیلونفریت. عفونت ادراری ممکن است به دو دسته ساده و پیچیده تقسیم بندی شود [۱۰].

عفونت های ساده در درجه اول در زنان سالم و گه گاه در نوزادان پسر و مردان نوجوان رخ می دهد. اغلب این عفونت ها به عوامل آنتی بیوتیکی که عامل بیماری نسبت به آن حساس باشد، به سرعت واکنش نشان داده و درمان می گردد. در عفونت ساده عود مشاهده نمی شود [۱۰].

عفونت های پیچیده در هر دو جنس اتفاق می افتد. افرادی که به عفونت های پیچیده دچار می شوند، اغلب دچار عوامل خطر ساز مشخصی هستند که در بخش بعدی به آنها اشاره خواهیم کرد. در این حالت درمان مشکل تر بوده و معمولاً نسبت به چندین آنتی بیوتیک، مقاوم می باشند و عوارض درمان (مانند آسیب کلیوی، باکتریمی) و مرگ ناشی از آن در مقایسه با عفونت های ساده بیشتر است [۱۰]. در بیمارانی که مبتلا به عفونت ادراری مزمن و یا عود کننده می شوند، باکتریوری مکرر با یا بدون علائم بالینی رخ می دهد. این نوع عفونت به دو صورت بازگشت عفونت^{۱۵۸} یا عفونت مجدد^{۱۵۹} رخ می دهد. در بازگشت عفونت، عامل ایجاد کننده همان ارگانیسم اولیه است که نشان دهنده وجود یک کانون عفونی در کلیه و یا پروستات می باشد،

Urethritis^{۱۵۰}
Asymptomatic bacteriuria^{۱۵۱}
Cystitis^{۱۵۲}
Acute Urethral Syndrome^{۱۵۳}
Relapse^{۱۵۴}
Reinfection^{۱۵۵}

در حالیکه در عفونت مجدد ارگانیزم دیگری سبب عفونت شده و معمولاً عفونت محدود به مثانه می‌باشد [۱۰].

۱-۱۱-۲ اورتریت

علائم مربوط به اورتریت (عفونت مجرا)، سوزش و تکرر ادرار می‌باشد. اورتریت عفونتی رایج و منتقله از راه جنسی می‌باشد. از عوامل شایع ایجادکننده اورتریت می‌توان به کلامیدیا تراکوماتیس،^{۱۶۰} نایسریا گنوره^{۱۶۱} و تریکوموناس واژینالیس^{۱۶۲} اشاره نمود [۱۰].

۱-۱۱-۳ باکتریوری بدون علامت

باکتریوری بدون علامت، جداسازی باکتری با شمارش مشخص از نمونه ادراری می‌باشد که طی یک نمونه-گیری صحیح، از فرد فاقد علائم عفونت ادراری گرفته شده باشد. باکتریوری بدون علامت، نسبتاً شایع است اما بسته به سن، جنس و وجود ناهنجاری دستگاه ادراری-تناسلی یا بیماری‌های زمینه‌ای، شیوع آن متفاوت می‌باشد [۱۰].

۱-۱۱-۴ عفونت مثانه

در این بیماران علائم شامل سوزش، تکرر و اضطراب^{۱۶۳} ادرار می‌باشد. اغلب، در ناحیه مثانه درد وجود دارد. در برخی موارد، ادرار به شدت خون‌آلود است. به دلیل آنکه عفونت مثانه یک عفونت موضعی است، در آن تب و دیگر علائم سیستمیک وجود ندارد [۱۰].

^{۱۵۶} Chlamydia trachomatis
^{۱۵۷} Neisseria gonorrhoea
^{۱۵۸} Trichomonas vaginalis
^{۱۵۹} Urgency

۱-۱۱-۲-۵ سندرم حاد مجرا

بیماران مبتلا به این سندرم در درجه اول زنان جوان و دارای فعالیت جنسی هستند که از سوزش، تکرر ادرار رنج می‌برند، اما تعداد باکتری در کشت ادرار آنها کمتر از 10^5 واحد تشکیل‌دهنده کلنی^{۱۶} در هر میلی‌لیتر (CFU/ml) است. در این گروه از بیماران، باید به‌جای معیار 10^5 CFU/ml از 10^2 CFU/ml به عنوان cutoff استفاده شود، اما باید در این شرایط بر وجود همزمان گلبول سفید در ادرار (وجود ۸ عدد یا بیشتر گلبول سفید در هر میلی‌متر میکروسکوپی ادرار سانتیفیوژ نشده) تاکید گردد. تقریباً ۹۰٪ از این زنان به پیوری (وجود گلبول سفید در ادرار)، مبتلا هستند [۱۰].

۱-۱۱-۲-۶ پیلونفریت

پیلونفریت به التهاب بافت اصلی کلیه، کالیکس‌ها (بخش فنجانی شکل در لگنچه کلیه)، لگنچه (انتهای فوقانی میزنای که در داخل کلیه واقع شده است) گفته می‌شود که معمولاً بر اثر عونت باکتریایی ایجاد می‌گردد. از علائم پیلونفریت، وجود تب و درد پهلو، همچنین علائم مربوط به دستگاه تحتانی (تکرر ادرار، اضطراب و سوزش ادرار) می‌باشد. بیماران همچنین ممکن است علائم سیستمیک عفونت نظیر استفراغ، اسهال، لرز، افزایش ضربان قلب و درد در ناحیه تحتانی شکم را بروز دهند [۱۰].

افرادی که به عفونت‌های پیچیده دچار می‌شوند، اغلب دچار عوامل خطر ساز مشخصی هستند. برخی از این عوامل شامل: بیماری‌های زمینه‌ای که کلیه را مستعد ابتلاء به عفونت می‌کنند (مانند دیابت و کم‌خونی داسی-شکل)، سنگ‌های کلیوی، اختلالات عملکردی یا ساختاری دستگاه ادراری (مانند ناهنجاری مثانه)، سوندگذاری طولانی مدت. شایع‌ترین عامل عفونت ادراری اکتسابی غیر بیمارستانی، اشریشیاکلی می‌باشد. از

دیگر باکتری‌های شایع می‌توان به گونه‌های کلبسیلا، سایر انتروباکتریاسه‌ها، استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس^{۱۶۵} و انتروکک‌ها^{۱۶۶} اشاره نمود. در انواع پیچیده‌تر عفونت ادراری، عواملی چون پروتئوس، سودوموناس، کلبسیلا و گونه‌های انتروباکتر بیشتر جدا می‌شوند [۱۰]. بیماران بستری بیشتر با اشریشیاکلی، گونه‌های کلبسیلا و پروتئوس، استافیلوکوک‌ها و سایر گونه‌های انتروباکتریاسه‌ها، سودوموناس آئروژینوزا، انتروکک‌ها و گونه‌های کاندیدا^{۱۶۷} آلوده شوند. قرار گرفتن اجسام خارجی (مانند کاتتر فولی) در داخل دستگاه ادراری، به ویژه اگر سبب انسداد گردند، سبب عفونت ادراری خواهند شد. ۲۰٪ از بیماران بستری که مدت کوتاهی سوند دریافت نموده‌اند، به عفونت ادراری دچار می‌شوند. از دیگر عواملی که کمتر سبب عفونت ادراری خواهند شد، می‌توان به اسیتوباکتر،^{۱۶۸} سایر گونه‌های سودوموناس، گونه‌های سیتروباکتر،^{۱۶۹} گاردنرلا واژینالیس^{۱۷۰} و استرپتوکوک‌های بتا همولایتیک^{۱۷۱} اشاره نمود [۱۰].

۱-۱۱-۲-۲ مننژیت نوزادان

اشریشیاکلی و گروه B استرپتوکوکوس عامل درصد بالایی از عفونت‌های CNS در کودکان با سن کمتر از یک ماه هستند. در نوزادان بویژه نوزادان نارس باکتری می‌کلی باسیل همراه با مننژیت و پیلونفریت (راه خونی) می‌باشد. الودگی به مدفوع و فقدان ایمونوگلوبولین IgG مادری و IgM از عواملی هستند که این قبیل کودکان را به عفونتهای کلی باسیلی حساس می‌کنند. در این قبیل موارد اشریشیاکلی در واژن مادر متمرکز می‌شود و یا این که سبب الوده شدن مایع امینوتیک شده و در نتیجه نوزاد دچار مننژیت می‌گردد.

Staphylococcus saprophyticus^{۱۶۱}
Enterococcus spp.^{۱۶۲}
Candida spp.^{۱۶۳}
Acinetobacter^{۱۶۴}
Citrobacter spp^{۱۶۵}
Gardnerella vaginalis^{۱۶۶}
 B-hemolytic streptococci^{۱۶۷}

عامل حدود ۷۵ درصد این مننژیت ها کلی باسیل دارای انتی ژن K1 است. در کودکان خردسال کلی باسیل ممکن است به دنبال عفونت اولیه در بدن منتشر شود و مننژیت ایجاد کند [۲۷-۲۵ و ۱۶-۱۲].

۱-۱۱-۲-۳ سپسیس (عفونت خونی)

اشریشیا کلی شایعترین باکتری گرم منفی عامل سپتی سمی و معمولترین ارگانیسمی است که از کشت خون جدا می شود. به طور معمول از عفونت های مجاری ادراری یا گوارشی منشاء می گیرد. هنگامی که وارد سیستم خونی شده باکتری می و عفونت خون ایجاد نماید، نوزادان نسبت به سپتی سمی ناشی از آن حساس ترند زیرا آنها فاقد انتی بادی IgM می باشند. شوک اندوتوکسیک خطر اصلی سپتی سمی می باشد [۲۷-۲۵ و ۱۶-۱۲].

۱-۱۱-۲-۴ عفونت ریوی (پنومونی)^{۱۷۲}

اشریشیا کلی عامل ۱۲ تا ۵۰ درصد پنومونی های بیمارستانی است که به خصوص در افراد بالای ۵۰ سال بروز می کند [۲۷-۲۵ و ۱۶-۱۲].

۱-۱۱-۲-۵ عفونت های بیمارستانی^{۱۷۳}

عفونتهای بیمارستانی مانند: عفونت زخمهای جراحی و سپتی سمی در اثر استفاده از کاتتر توسط اشریشیاکلی بروز می کند. حدود ۴۰٪ عفونت های بیمارستانی در مجرای ادراری رخ می دهد که عامل آن در ۵۰ درصد موارد اشریشیاکلی است. در پنومونی های ناشی از اشریشیاکلی پتشی های^{۱۷۴} در برونش ظاهر می گردد [۲۷-۱۲].

^{۱۷۲} Pneumonia
^{۱۷۳} Infection Nosocomial
^{۱۷۴} Petechiae

۱-۱۱-۲-۶ سایر عفونت ها

اشریشیا کلی می تواند سبب عفونت هایی همچون: عفونت های صفراوی،^{۱۷۵} پریتونیت،^{۱۷۶} اندوکاردیت،^{۱۷۷} آپاندیسیت،^{۱۷۸} باکتریمی،^{۱۷۹} سپتسمی و غیره که عامل این عفونت ها ناشی از اشریشیا کلی ظاهر می گردد [۱۲-۲۷].

۱۲-۱ عوامل مؤثر و تشدید کننده بیماری زایی

۱-۱۲-۱ بیوفیلم^{۱۸۰}

بیوفیلم که اجتماعی از میکروارگانیسم های قرار گرفته در ماتریکسی از پلی مرهای خارج سلولی است، از روش طبیعی زندگی باکتریایی جلوگیری می کند و تصور می شود که مسئول بسیاری از عفونت های سخت و مزمن باشد [۱۰۸-۱۰۷]. اصولاً باکتری ها وقتی تشکیل بیوفیلم می دهند مقاومت آنها نسبت به شرایط نامساعد محیطی و بیوسایدها زیاد می شوند و از طرف دیگر در بیوفیلم مواد را نگهداری و تغلیظ می نمایند و از مواد متابولیکی یکدیگر مصرف می کنند. در یک بیوفیلم ممکن است جذب مواد آلی و تغذیه کمتر از زمانی باشد که باکتری ها آزاد هستند ولی پایداری ژنتیکی در آن ها بیشتر است و پلاسمیدها در بیوفیلم پایدارتر می باشند. تشکیل بیوفیلم باکتری ها را نسبت به مواد ضد باکتری یایی مقاوم تر می سازد. نتایج به دست آمده نشان داده است که شرایط استرس سبب افزایش چسبیدن باکتریایی می شود درحالیکه، توانایی چسبیدن به سویه باکتریایی ارتباط دارد ولی متناسب با غلظت ماده غذایی نیست. باکتری ها در بیوفیلم کاهش حساسیت شدیدی به آنتی بیوتیک ها و سایر عوامل ضد

^{۱۷۵} Biliary infection
^{۱۷۶} Peritonitis
^{۱۷۷} Endocarditis
^{۱۷۸} Apandysyt
^{۱۷۹} Bacteriemia
^{۱۸۰} Biofilm

میکروبی دارند و این کاهش حساسیت مستقل از حضور عوامل ایجاد مقاومت بر روی عناصر ژنتیکی متحرک روی می دهد [۱۰۹]. یافته ها نشان داده است غلظت عوامل ضد میکروبی مورد نیاز برای از بین بردن باکتری های دارای بیوفيلم ۱۰ تا ۱۰۰۰ بار بیشتر از باکتری های پلانکتونیک هستند و مقاومت آن ها به فاگوسیتوز موجب شده است که به سختی از میزبان زنده حذف شوند [۱۱۰]. بیوفيلم در یک محیط آبی به وسیله اتصال باکتری به سطوح غوطه ور در آب تشکیل می شود. بیوفيلم باکتری توسط ضمایمی مانند تاژک [۱۱۱] و پیلی [۱۱۲] و همچنین میکروکلونی هایی که به وسیله فراورده های خود باکتری تولید می شود مانند پلی ساکارید [۱۱۱]، گلیکوپروتئین [۱۱۳] و DNA [۱۱۴] به سطوح اتصال پیدا می کند [۱۱۵].

برای مثال بیوفيلم *E. coli* در دستگاه گوارش و دستگاه ادراری تشکیل می شود به طوری که باکتری اشریشیا کلی اوروپاتوژنیک در مثانه و کلیه باعث ایجاد عفونت می شود و گزارش شده است که اشریشیا کلی مسئول ۸۰ تا ۹۰٪ عفونت ادراری (UTIs) اکتسابی از جامعه و ۳۰ تا ۵۰٪ کسب شده از بیمارستان است. سویه های اوروپاتوژنیک اشریشیا کولی مجهز به یک مجموعه ویژه ای از فاکتور های بیماری زا هستند که به آن ها اجازه کلونیزاسیون در قسمت های ویژه ای از سیستم ادراری را می دهد. سطح هیدروفوبیک سلول، فیمبریه P و فیبر cruli به باکتری این توانایی را می دهد که به طور موفقیت آمیزی عفونت در دستگاه ادراری را آغاز کند. سلول های باکتری بعد از اتصال اولیه به بافت میزبان شروع به رشد می کنند و به صورت یک لایه روی سطوح منتشر می شوند تا زمانی که تشکیل میکروکلونی دهند که این می تواند باعث تشکیل بیوفيلم شود. ارتباط بیوفيلم اشریشیا کلی با عفونت ادراری عود کننده و مزمن مرتبط با کاتتر ادراری به طور فراوانی شرح داده شده است [۱۱۶]. تشکیل بیوفيلم به طور قابل توجهی مقاومت باکتری را به آنتی بیوتیک و دفاع ذاتی میزبان افزایش می دهد. روش های دفاعی به کار گرفته شده توسط سلول های داخل بیوفيلم با سلول های پلانکتونیک که شامل فعال سازی پمپ های افلاکس، کسب آنزیم های جدید و جهش در جایگاه هدف دارو می باشد متفاوت است. به طور کلی فیزیولوژی خاص

سلول های بیوفیلم و عملکرد سد فیزیکی و شیمیایی ماتریکس خارج سلولی بیوفیلم میزان مقاومت به عوامل ضد باکتریایی مانند آنتی بیوتیکها و فاکتورهای دفاعی میزبان را تعیین می کند. از آنجایی که سلول ها در داخل بیوفیلم با حالت آهسته ای از رشد وفق پیدا کرده اند به طور نسبی به آنتی بیوتیک های باکتریسیidal غیر حساس هستند. غلظت موثر دارو می تواند به طور منفی توسط واکنش ماتریکس بیوفیلم با آنتی بیوتیکها و پپتید های ضد میکروبی اثر بگذارد. روش کار این پلیمرها ممکن است دفع الکترواستاتیک و یا تجزیه سوبسترای ضد باکتریایی باشد [۱۱۷]. تشکیل بیوفیلم یکی از مکانیسم های بیماری زایی شناخته شده در عفونت های مربوط به بیوفیلم در بیمارستان نیز می باشد. بسیاری از این عفونت های بیمارستانی مانند عفونت های مرتبط به استفاده از کاتترهای وریدی [۱۱۸]، کاتترهای ادراری [۳۲]، پروستاتیک دریچه قلب و وسایل اورتوپدی [۱۲۰] به طور واضحی مرتبط به بیوفیلم متصل به سطوح مواد زیستی هستند. این عفونت ها ویژگی مشترک بسیاری حتی در مواقعی که تصور می شود عامل میکروبی و محل عفونت میزبان بسیار متفاوت است، را دارند. همچنین بیان شده است که تشکیل بیوفیلم یک مرحله بسیار مهم در اکثر بیماری های باکتریایی مانند اندوکاردیت، اوستئومیلیت، پوسیدگی دندان، عفونت گوش میانی، عفونت ناشی از لوازم پزشکی، عفونت چشم و عفونت مزمن ریه در بیماران سیستمیک فیبروزیس^{۱۸۱} است [۱۲۰-۱۱۹].

۱-۱۲-۲ آنتی توکسین TA

سیستم توکسین آنتی توکسین TA به طور گوناگون و گسترده در پروکاریوت ها وجود دارد. این سیستم شامل یک توکسین پایدار و یک آنتی توکسین ناپایدار است که همیشه در ترکیب با توکسین وجود دارد. ژن آنتی توکسین اغلب در بالا دست ژن^{۱۸۲} توکسین قرار دارد و معمولاً هم پوشانی دارند یا توسط یک ناحیه

Cystic fibrosis^{۱۸۱}
Upstream gene^{۱۸۲}

اینترژنیک^{۱۸۳} کوچک از هم جدا شده اند. ژن های سیستم TA با هم رونویسی می شوند و در اغلب موارد نیز با هم ترجمه می شوند. بیان اپرون TA توسط آنتی توکسین در سطح رونویسی به صورت خود تنظیمی کنترل می شود در حالی که توکسین به عنوان مهار کننده عمل می کند [۱۲۱]. سیستم توکسین آنتی توکسین حفظ پلاسمید را در جمعیت باکتریایی از طریق پایداری متفاوت توکسین پایدار و آنتی توکسین ناپایدار که هر دو روی پلاسمید کد می شود تضمین می کند. در صورت حضور پلاسمید می توان بیان پیوسته از آنتی توکسین داشت که به توکسین متصل می شود و آن را غیرفعال می کند. اگر پلاسمید در طی تقسیم سلولی از دست رود پروتئین آنتی توکسین به سرعت تجزیه می شود و دوباره ساخته نمی شود بنابراین رهایی توکسین پایدار سلول باکتری را می کشد. ژن های TA روی کروموزم های باکتری نیز وجود دارد. دو تا از مهم ترین سیستم های مطالعه شده *relBE* و *mazEF* است که در کروموزم *E.coli* کد می شود. در باکتری *E.coli* چندین جفت از سیستم های TA شامل *yefM-yoeB*, *relBE*, *chpBIK*, *mazEF*, *dinJ-yafQ*, *prlF* و *yhaV* وجود دارد [۱۲۸-۱۲۱].

۱-۱۲-۳ بیوفیلم و سیستم TA

یافته ها نشان می دهد رشد در بیوفیلم که یک استراتژی جمعی برای حفظ حیات باکتری مانند تحمل و مقاومت دارویی است می تواند به یک فرایند مداوم از تنوع فنوتیپی در میان سلول های متصل به سطح مرتبط باشد [۱۲۸]. یک نوعی از این تنوع فنوتیپی توسط یک نوع خاصی از جمعیت باکتریایی که سلول پایدار نامیده شده ایجاد می شود. این سلول ها از نظر متابولیکی خاموش هستند که در نتیجه، وقتی در معرض غلظت های باکتریسیدال آنتی بیوتیک ها قرار میگیرد نه رشد دارند و نه می رند [۱۲۹]. هرچند جمعیت های این وارسته های فیزیولوژیکی ۰٫۱٪ و یا کمتر از سلول های پلانکتونیک^{۱۸۴} در حال رشد

تصاعدی است [۱۳۰] اما سهم سلول های پایدار در بیوفیلم ممکن است بیشتر از ۱۰٪ باشد بنابراین معقول به نظر می رسد که سلول های پایدار در تحمل دارویی بیوفیلم باکتریایی نقش دارد. فلوروکینولون ها، فلزات با بار منفی که عوامل کشنده باکتری هستند وقتی که از ماتریکس عبور می کنند می توانند علیه سلول های فاقد رشد و یا با رشد آهسته موثر باشند اما حتی این عوامل هم نمی توانند جمعیت سلول های پایدار را در بیوفیلم حذف کنند [۱۳۱]. بنابراین این سلول ها نقش زیادی در سرسختی عفونت های ناشی از بیوفیلم دارند [۱۳۲]. ارتباط بین ژن های TA و پایداری بر اساس مشاهدات تجربی وجود دارد اما درک مکانیسم این پدیده هنوز نامشخص است. به عنوان مثال ارتباط ژنتیکی پایداری بین فراوانی سلول های پایدار در جمعیت اشیریشیا کلی و ژن های TA کروموزومی مانند *hipBA* و *ErelB* وجود دارد [۱۳۳]. Keren و همکاران در گذشته طی مطالعاتی که انجام داده اند گزارش کردند، که کشت های فاز سکون سویه اشیریشیا کلی با جهش دوگانه در ژن *hipBA* پس از آنکه مدتی در معرض آنتی بیوتیک قرار گرفتند زنده می مانند. علاوه بر این پروفایل رونویسی از ایزوله های پایدار کشت سلول های پلانکتونیک نشان می دهد که بیان ژن های *maze*، *yefM-yoeB*، *relE* و *dinJ-yafQ* در آن ها افزایش می یابد [۱۳۴]. از طرفی باکتری هایی که دارای مقاومت و یا تحمل نسبت به آنتی بیوتیک ها به دلیل تشکیل بیوفیلم هستند و سلامتی انسان را تهدید می کنند روز به روز در حال افزایش هستند. در واقع ۶۰٪ عفونت های باکتریایی گسترده در جهان توسط بیوفیلم به وجود می آید که تحمل زیادی به آنتی بیوتیک های گوناگون دارد [۱۲۷-۱۲۶].

۱-۱۳ جداسازی سویه های *E.coli*

برای جداسازی این باکتری از سایر باکتری ها، از روش های بیوشیمیایی و سرولوژیکی استفاده می گردد. امروزه از روش های مولکولی جهت شناسایی اشیریشیاکلی استفاده می شود. تست های بیوشیمیایی و سایر

روش های تشخیصی فنوتیپی ممکن است باعث تشخیص نادرست این باکتری گردد که این امر یک مانع جهت درمان دارویی و کنترل عفونت است. انتروباکتریاسه باسیل های گرم منفی کوچکی هستند. شکل تیپیک این باکتری ها در رشد بر محیط های جامد آزمایشگاهی دیده می شود، اما شکل این باکتری ها در نمونه های کلینیکی بسیار متنوع است. اشريشياکلی و اغلب باکتری های روده ایی کلونی های حلقوی، محدب و مسطح با لبه های واضح تشکیل می دهند. اشريشيا کلی جلای فلزی در محیط های افتراقی تشکیل می دهد و کلونی های آن صاف و غیر چسبنده است. از ویژگی های بیوشیمیایی نظیر الگوهای تخمیر کربوهیدرات و فعالیت دکربوکسیلاز های اسید های آمینه و سایر آنزیم ها برای افتراق باکتری ها استفاده می شود. بعضی آزمایش ها نظیر تولید ایندول از تریپتوفان^{۱۸۵} در سیستم های تشخیص سریع بسیار استفاده می شوند. اشريشياکلی بر روی محیط آگار مک کانکی،^{۱۸۶} کلونی های ارغوانی ایجاد می کند زیرا باکتری از نوع لاکتوز مثبت است و قند را تخمیر کرده و اسید تولید می کند. اسید موجب کاهش pH (غلظت یون هیدروژن: بهترین رشد بهینه در، 6-8 pH) و (دمای بهینه برای رشد ۳۰-۳۷ درجه سانتیگراد) و (زمان بهینه برای رشد ۱۸-۲۴ ساعت) در تغییر بلانک معرف pH در محیط آگار مک کانکی شده و در نتیجه رنگ ارغوانی ایجاد می شود. همین اتفاق نیز در محیط EMB^{۱۸۷} رخ داده که سبب رسوب ائوزین متیلن بلو شده و کلونی های ارغوانی تیره با جلای سبز فلزی ایجاد می کند. باکتری در محیط TSI^{۱۸۸} به صورت اسید/اسید و با تولید گاز و H₂S منفی است و کلونی های بزرگ خاکستری و بتا همولیتیک در محیط بلادآگار^{۱۸۹} تولید می کند. قادر به احیای نیتрат به نیتريت هستند. اکسیداز آن ها منفی است. از نظر تست IMViC به صورت اندول مثبت، MR مثبت، VP منفی و سیترات منفی است. برای بررسی وجود توکسین می توان از کشت سلولی یا PCR استفاده کرد [۱۱۸].

^{۱۸۵} Tryptophan
^{۱۸۶} MacConkey agar
^{۱۸۷} Eosin methylene blue agar (EMB)
^{۱۸۸} Triple sugar iron agar
^{۱۸۹} Blood Agar

۱-۱۴ مقاومت آنتی بیوتیکی

مقاومت آنتی بیوتیکی در بین باکتریها از سالهای دور یکی از مشکلات بهداشتی درمانی در سطح دنیا بوده است. در این میان برخی از انواع مقاومت های دارویی اهمیت فوق العاده ای در عفونتهای بیمارستانی دارند. نوعی از مقاومت به واسطه تولید آنزیم هایی به نام بتالاکتامازها^{۱۹۰} صورت می گیرد، که عامل مقاومت در برابر داروهای بتالاکتامی است. اخیرا برخی از سویه های باسیلهای گرم منفی و از جمله گونه های کلبسیلا پنومونیه و اشریشیاکلی پیدا شده اند، که نوع خاصی از آنزیم های را به نام ESBL^{۱۹۱} یا بتالاکتامازهای طیف گسترش یافته تولید می کنند. این سویه ها در برابر پنی سیلینها، سفالوسپورین های طیف وسیع و آزترونام (منوباکتام ها) از خود مقاومت نشان می دهند. برای میکروبیولوژیستهای بالینی، پزشکان، متخصصین حرفه ای کنترل عفونت، و تولید کنندگان داروهای ضد باکتریال سویه های ESBL مشکلات لاینحلی را ایجاد نموده اند. اشریشیا کلی نسبت به بسیاری از آنتی بیوتیک هایی مورد استفاده برای باکتری های گرم مثبت مقاوم است. از آنتی بیوتیک هایی که در درمان بیماری های ناشی از اشریشیاکلی استفاده می شوند می توان به آموکسی سیلین، وسایر پنی سیلین های نیمه سنتزی و همچنین بسیاری از آنتی بیوتیک های دیگر مثل سفالوسپورین ها اشاره کرد[۳۲].

۱-۱۵ آنتی بیوتیک های مورد استفاده

۱-۱۵-۱ تاریخچه

از زمانی که سولفانامیدها و پنی سیلین ها پا به عرصه وجود گذاشتند، دنیای جدیدی در درمان بیماریها ایجاد شد. در نخستین روزهای کاربرد این داروها، اپیدمی های خانمان برانداز متعددی فرونشانده شدند. اما

^{۱۹۰} Betalactamases
^{۱۹۱} Extended Spectrum Beta-Lactamase(ESBL)

در هر حال بیماری های ناشی از ارگانیزم های عفونی به صورت یک مشکل جدی باقی مانده است [۱۳۸] - [۱۳۶]. انسان ها با خطر عفونت های باکتریایی در طول تاریخ همیشه گرفتار بوده اند و در نتیجه علاقه زیادی در جهت پیدا کردن یک درمان مناسب برای این عفونت ها بوده اند. در سال ۱۹۲۸ الکساندر فلمینگ مشاهده کرد که پلیت های کشت استافیلوکوک که به کپک الوده شده بودند از رشد باکتری در مجاورت با این کپک ممانعت به عمل آمده است. سپس او این کپک را خالص سازی کرد و نشان داد که تولید یک ترکیب ضد باکتریال به نام پنی سیلین می کند [۱۳۹]. طی مدت کوتاهی بعد از آن پنی سیلین های با طیف گسترده و سفالوسپورین های نسل اول معرفی شدند. قبل از اینکه بتالاکتامها به شکل گسترده توسط باکتری ها تولید شود این آنتی بیوتیک ها به مدت بیش از بیست سال به عنوان خط اول درمان در مقابل میکروب ها بودند [۱۴۰]. آنتی بیوتیک های بتالاکتام به دهه ۱۹۴۰ و ۱۹۵۰ بر می گردد زمانیکه تنها دو نوع بتالاکتام شناسائی شده بود، پنی سیلین G و پنی سیلین V. پنی سیلین G اولین آنتی بیوتیک بتالاکتام معرفی شده در مصارف بالینی بود. تا قبل از دهه ۱۹۶۰ پنی سیلین های نیمه سنتزی وجود نداشتند و به دنبال آن تولید سفالوسپورین های نیمه سنتزی و دیگر آنتی بیوتیک های بتالاکتام توسعه پیدا کرد [۱۴۱].

۱-۱۵-۲ بتالاکتام ها^{۱۹۲}

بتالاکتام ها به یک خانواده از آنتی بیوتیک ها تعلق دارند که این خانواده توسط یک حلقه بتالاکتام شناسایی می شوند. تمامیت و انسجام حلقه بتالاکتامی برای فعالیت این خانواده آنتی بیوتیکی ضروری می باشد. عمل آنتی بیوتیک های بتالاکتام باعث می شود تا یک سری از ترانس پپتیدازهایی که واکنش های نهایی پل های عرضی (Cross-Linking) در سنتز پپتید و گلیکان را کاتالیز می کنند، غیر فعال شوند [۱۴۲].

بتالاکتام ها داروهایی جهت درمان سودوموناس آئروژینوزها بودند. اما بعد از مدتی برخی از باکتری ها با تولید بتالاکتاماز به این آنتی بیوتیک ها مقاومت نشان دادند[۱۴۳]. مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های بتالاکتام در مرحله اول ناشی از هیدرولیز آنتی بیوتیک به وسیله یک بتالاکتاماز است، بروز موتاسیون هایی که باعث تغییر در PBP^{۱۹۳} می شوند یا تراوایی سلول را تغییر می دهند نیز منجر به ایجاد مقاومت در برابر بتالاکتام ها می شود. بتالاکتامازها متشکل از یک گروه آنزیمی هتروژن هستند[۱۴۲].

۱-۱۵-۳ ساختمان شیمیایی بتالاکتام ها

آنتی بیوتیک های بتالاکتام دارای حلقه بتالاکتام بوده که چندین اتم شامل سه اتم کربن و یک اتم نیتروژن به آن متصل هستند. حلقه بتالاکتام در پنی سیلین های طبیعی و نیمه سنتزی به یک حلقه تiazolidone^{۱۹۴} متصل است. در سفالوسپورین ها حلقه بتالاکتام به یک حلقه دی هیدروتiazین متصل است. کاربایتم ها حلقه بتالاکتام با یک زنجیره جانبی هیدروکسیل استیل ترکیب شده که فاقد اتم اکسیژن یا سولفور در هسته دو حلقه ای خود می باشد. در مقایسه با این آنتی بیوتیک ها، کلاوولانیک اسید که یک مهار کننده بتالاکتاماز می باشد مرکب از یک حلقه بتالاکتام متصل شده به یک حلقه اگزازولیدین^{۱۹۵} می باشد. به طور کلی با تغییر گروه های R خصوصیات دارویی و ضدباکتریایی آنتی بیوتیک های بتالاکتام تغییر پیدا می کند. به عنوان مثال جا به جایی در موقعیت شماره ۷ از سفالوسپورین ها، ورود این آنتی بیوتیک به فضای پری پلاسمی و پایداری آنرا در برابر بتالاکتامازها افزایش اما تاثیر گذاری آنتی بیوتیک را کاهش می دهد[۱۴۴].

۱-۱۵-۴ طبقه بندی

^{۱۹۳} Penicillin binding proteins
^{۱۹۴} Thiazolidines
^{۱۹۵} Oxazolidine

آنتی بیوتیک های بتالاکتام در حال حاضر شامل شش دسته : پنی سیلین ها،^{۱۹۶} سفالوسپورین ها،^{۱۹۷} سفامیسین ها،^{۱۹۸} کارباپنم ها،^{۱۹۹} منوباکتام ها^{۲۰۰} و مهار کننده های بتا لاکتامازها تقسیم بندی می شوند [۱۴۵].

۱-۱۵-۴-۱ پنی سیلین ها

همه پنی سیلین ها دارای یک ساختمان اصلی مشابه هستند. در این گروه آنتی بیوتیک ها حلقه تiazolidine به یک حلقه بتالاکتام اتصال می یابد و یک گروه آمینی آزاد را حمل می کنند. بنیان های اسیدی که با گروه آمینی پیوند یافته اند، می توانند توسط آمیداز باکتری ها شکسته شوند. حفظ ساختمان هسته اسیدی آمینو پنی سیلانیک برای فعالیت ترکیبات پنی سیلین ضروری است. اگر حلقه بتالاکتام توسط آنزیم بتالاکتاماز (پنی سیلیناز) شکسته شود، ترکیب حاصل یعنی اسید پنی سیلونیک فعالیت ضد میکروبی خود را از دست خواهد داد [۱۲].

پنی سیلین طبیعی

✓ بنزیل پنی سیلین^{۲۰۱} (پنی سیلین G)

✓ فنوکسی متیل پنی سیلین^{۲۰۲} (پنی سیلین V)

✓ پنی سیلین های نیمه سنتتیک مقاوم به پنی سیلیناز

✓ متی سیلین

✓ کاربنی سیلین و تیکارسیلین

Penicillins	۱۹۶
Cephalosporins	۱۹۷
Cephameycins	۱۹۸
Carbapenem	۱۹۹
Monobactam	۲۰۰
Benzylpenicillin	۲۰۱
Phenoxymethylpenicillin	۲۰۲

✓ نافی سیلین

✓ ایزو زایلول پنی سیلین

✓ کلوکساسیلین

✓ دی کلوکساسیلین

✓ اکساسیلین

پنی سیلین های طیف گسترده

✓ آمینوپنی سیلین ها: آمپی سیلین و آموکسی سیلین و باکامپی سیلین

✓ کربوکسی پنی سیلین ها

✓ یوریدو پنی سیلین ها

✓ آزلوسلین و مزلوسلین و پی پراسیلین

ترکیبات پنی سیلین + مهار کننده بتالاکتاماز

✓ آمپی سیلین + سالباکتام^{۲۰۳}

✓ آموکسی سیلین + کلانونات^{۲۰۴}

✓ تیکارسیلین + کلانونات^{۲۰۵}

✓ پراسیلین + تازوباکتام^{۲۰۶} [۱۲].

Unasyn^{۲۰۳}
Augmentin^{۲۰۴}
Timentin^{۲۰۵}
Tazosyn^{۲۰۶}

• پنی سیلین های طبیعی:

✓ پنی سیلین G: این آنتی بیوتیک در محیطی ترشح می شود که فنیل استیک اسید در محیط کشت قارچ پنی سیلیوم وجود داشته باشد. به طور اولیه برای درمان عفونت های ناشی از باکتری های گرم مثبت نظیر پنوموکوک، استافیلوکوک و استرپتوکوک مصرف می گردید. همچنین برای درمان باکتری های گرم منفی نظیر نایسریا مننژیتیدیس و نایسریا گونوره نیز موثر می باشد. به علت کسب مکانیسم های مقاومت نسبت به پنی سیلین G توسط باکتری ها، امروزه عفونت های ایجاد شده با بسیاری از این باکتری ها را نمی توان با اطمینان توسط پنی سیلین G درمان نمود [۱۴۵-۱۴۷].

✓ پنی سیلین V: در محیط کشت حاوی دهنده های گروه فنوکسی متیل، تولید می شود. بر خلاف پنی سیلین G که به صورت تزریقی تجویز می شود، پنی سیلین V را می توان از طریق خوراکی مصرف نمود. این داروها استفاده فراوان در طب کودکان دارند [۱۴۵-۱۴۷].

• پنی سیلین های نیمه صنعتی:

✓ پنی سیلین های مقاوم به پنی سیلیناز: پنی سیلین های مقاوم به پنی سیلیناز برای درمان سویه های استافیلوکوک مولد پنی سیلیناز مقاوم به پنی سیلین G طراحی شده اند. این پنی سیلین ها شامل متی سیلین، نافسیلین و پنی سیلین های ایزوگزازولیل (اگراسیلین، کلوگراسیلین، دی کلوگراسیلین و فلوکلوگراسیلین) می باشد [۱۴۵-۱۴۶].

✓ پنی سیلین های با طیف گسترده: این گروه از پنی سیلین های نیمه صنعتی برای افزایش فعالیت ضد میکروبی و تاثیرگذاری بر باکتری های گرم منفی طراحی شده اند. این گروه شامل آمینوپنی سیلین ها (آمپی سیلین، آموکسی سیلین و باکامپی سیلین) و آمیدینوسیلین (پیومسیلینام) می باشند [۱۴۵-۱۴۶].

✓ پنی سیلین های ضد سودوموناسی: سه نوع پنی سیلین برای از بین بردن سودوموناس آئروژینوزا ساخته شده است. این پنی سیلین های ضد سودوموناسی عبارتند از: کربوکسی پنی سیلین ها، پی پرازین پنی سیلین ها، یورئیدوپنی سیلین ها. کاربنی پنی سلین ها و تی کارسیلین از انواع کربوکسی پنی سیلین ها بوده و اولین پنی سیلین ضد سودوموناسی می باشند [۱۴۵-۱۴۶].

۱-۱۵-۴-۲ سفالوسپورین ها

بعضی از قارچ های سفالوسپوریوم مواد آنتی بیوتیکی تولید می کنند که سفالوسپورین نامیده می شوند. ترکیبات بتالاکتام دارای یک هسته ۷-اسید آمینو سفالوسپورین به جای ۶- آمینو پنی سیلایک است. سفالوسپورین ها بزرگترین گروه از آنتی بیوتیک های بتالاکتام را تشکیل می دهند. سفالوسپورین ها را بر اساس تاثیر بر باکتری های گرم منفی به سه گروه (نسل) عمده دسته بندی می کنند. تعدادی از سفالوسپورین ها که جدیداً ساخته شده اند در گروه چهارم و پنجم جای می گیرند [۱۲].

(I) سفالوسپورین های نسل اول: سفادروکسیل، سفالوتین، سفالکسین، سفازولین، سفاپیرین، سفراپین و... از سفالوسپورین های نسل اول هستند. سفالوسپورین های نسل اول شامل اولین سفالوسپورین های ساخته شده می باشند. اثر آنها در درجه اول علیه گروهی از باکتری های گرم مثبت شامل پنوموکوک، استرپتوکوک، کلستریدیوم پرفرژنس، کورینه باکتریوم دیفتریه، استافیلوکوک اپیدرمیدیس و سویه های حساس به متی سیلین استافیلوکوک اورئوس می باشد. اثری بر روی سویه های تولید کننده بتالاکامازهای با طیف گسترده ندارد [۱۴۷-۱۴۵ و ۱۲].

(II) سفالوسپورین های نسل دوم: سفالوسپورین هانسل دوم شامل سفامندل، سفانیسید، سفوروکسیم، سفاکلور... می باشند. فعال تر از سفالوسپورینهای نسل اول علیه باکتری های گرم منفی بوده و اثر آنها بر

باکتری های گرم مثبت قابل مقایسه و یا اندکی کمتر از نسل اول می باشد. فعالیت فراوان سفوروکسیم بر علیه ایزوله های تولید کننده بتالاکتاماز هموفیلوس آنفلوانزا و نایسریا منتریتیدیس دو عامل عمده مننژیت در کودکان به اثبات رسیده است. بیشتر سفامایسین ها (سفوکسیتین و سفوتتان) نیز به عنوان آنالوگ های سفالوسپورین های نسل دوم شناخته می شوند [۱۴۷-۱۴۵ و ۱۲].

(III) سفالوسپورین های نسل سوم: سفوتاکسیم، سفتریاکسون، سفتی زوکسیم، سفونیر، سیفوتین، سفتازیدیم، سفیدوکسیم، سفوپروزان و... از سفالوسپورین های نسل سوم هستند. این گروه به علت داشتن گروه های R غیر معمول و بزرگ، به شدت نسبت به عمل بتالاکتامازها مقاومند. اگرچه سفالوسپورین های نسل سوم در مقایسه با سایر سفالوسپورین ها بیشترین طیف فعالیت را علیه باکتری های گرم منفی دارا می باشند، فعالیت آنها علیه باکتری های گرم مثبت ناچیز است. اثر فوق العاده این داروها علیه باکتری های گرم منفی به دلیل میل ترکیبی شدید آنها برای اتصال به PBPs در این باکتری ها می باشد [۱۴۷-۱۴۵ و ۱۲].

(IV) سفالوسپورین های نسل چهارم: جدیدترین سفالوسپورین شناخته شده سفپروم و سفپیم می باشند. سفپیم فعالیت زیادی علیه گونه های انتروباکتر و سیتروباکتر که به سفالوسپورین های نسل سوم مقاومند، دارد. سفپیم فعالیت تقریباً "یکسانی با سفتازیدیم علیه سودوموناس آئروژینوزا دارد. فعالیت این دارو علیه گونه های استرپتوکوک و استافیلوکوک حساس به متی سیلین بیشتر از سفتازیدیم بوده و با فعالیت سایر ترکیبات نسل سوم قابل مقایسه است [۱۴۷-۱۴۵]. لازم به ذکر است که بعضی از سفالوسپورین های نسل ۳ و ۲ می توانند بتالاکتاماز را در باکتری های گرم منفی القاء کنند [۱۲].

(V) سفالوسپورین های نسل پنجم:

۱-سفتوبی پرول: دارای ویژگیهای ضد سودوموناسی قدرتمندی، که به نظر می رسد کمتر مستعد گسترش مقاومت است.

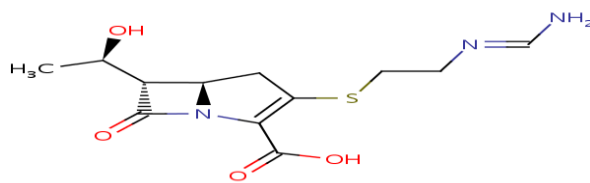
۲-سفتارولین: بر علیه MRSA فعال به نظر می رسند . سفتارولین فعالیت ضد گرم مثبتی افزایش یافته ای(شامل MRSA و پنوموکوک های مقاوم به پنی سیلین) دارد [۱۴۶-۱۴۵و۱۲].

۱-۱۵-۳-۴ کارباپنم ها

در سالهای اخیر، کارباپنم ها (شامل: ایمپنم^{۲۰۷}، ارتاپنم^{۲۰۸}، دوری پنم^{۲۰۹} و مروپنم^{۲۱۰}) آنتی بیوتیک های انتخابی در درمان عفونت های ناشی از *E.coli* مقاوم محسوب می شوند. از نظر ساختمان فضایی متفاوت از پنی سیلین ها و سفالوسپورین ها می باشند و شکل فضایی آنها ترانس است. این دسته از داروها به طریق صناعی از تینامایسین ساخته می شوند. هر چند که تینامایسین در درمان عفونت های انسانی استفاده نمی شود، ولی یکی از مشتقات Formimidoyl آن یعنی ایمپنم به عنوان یکی از وسیع ترین آنتی بیوتیک های بتالاکتام مصرف بالینی دارد. کارباپنم ها ساختمان دو حلقه ای داشته و شامل حلقه بتالاکتام و یک حلقه غیر اشباع پنج کربنه است که به جای اتم کربن در موقعیت ۱، اتم گوگرد قرار دارد [۱۲]. یکی از آنتی بیوتیک های با طیف گسترده در این گروه ایمپنم می باشد. ایمپنم با اتصال قوی به PBP1 و PBP2 از عمل ترانس پپتیداسیون ممانعت می کند و در برابر بسیاری از بتالاکتامازها به انضمام بتالاکتامازهای کروموزومی کلاس ۱ که سبب تخریب سفالوسپورین های نسل سوم می گردند، مقاوم است. ایمپنم به خوبی به سلول های گرم منفی نفوذ نموده و بر علیه باکتری های بی هوازی نیز موثر است. از دیگر کارباپنم ها می توان مروپنم و ارتاپنم را نام برد [۱۴۶-۱۴۴]. ایمپنم توسط دی هیدروپپتیدازها در توبول های کلیه غیرفعال می شوند. بنابراین، همواره با سیلاستین^{۲۱۱} که مهار کنندهی پپتیداز است تجویز می شوند. تجویز ایمپنم به همراه سفالوسپورین ها جایز نیست چرا که این دارو سبب بیان بتالاکتامازهای

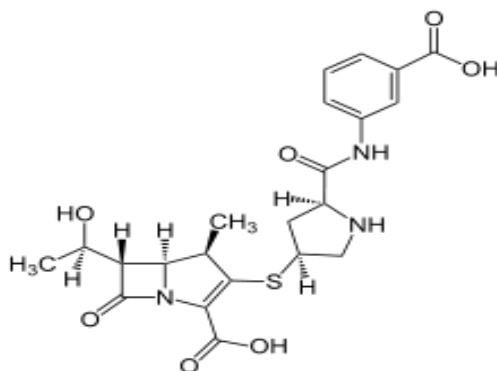
Imipenem^{۲۰۷}
Ertapenem^{۲۰۸}
Doripenem^{۲۰۹}
Meropenem^{۲۱۰}
Cilastain^{۲۱۱}

کروموزومی کلاس ۱ می گردد. تمام سفالوسپورین ها توسط بتالاکتامازها کلاس ۱ غیر فعال می شوند و اسید کلاولانیک و سولباکتام قادر به غیر فعال کردن بتالاکتامازها کلاس ۱ به تنهایی نیستند. امروزه کارباپنم ها به عنوان داروی انتخابی در درمان بیماران مبتلا به ارگانیزم های تولید کننده ی ESBL به کار می روند. این داروها در برابر هیدرولیز کنندگی ESBL کاملاً پایدار بوده و به علت اندازه مولکولی فشرده و ساختار زئوترونیک خود به راحتی از غشای خارجی عبور می کنند. مطالعات نشان داده که درمان با ایمپنم در بیماران مبتلا به ارگانیزم های مولد ESBL پیامد های بهتری نسبت به داروهای ترکیبی دارد [۱۴۷].



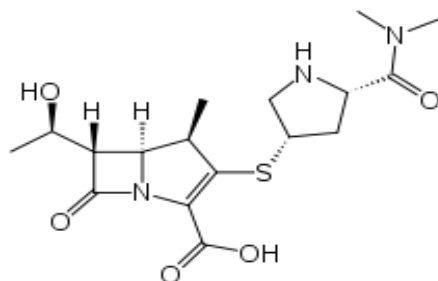
Imipenem

مروپنم از نظر فارماکولوژی و طیف اثر ضد میکروبی مشابه ایمپنم است. البته، این دارو توسط دی پپتیدازها غیر فعال نمی شود با مصرف آن احتمال بروز تشنج، نسبت به ایمپنم کمتر است [۱۴۷].



Meropenem

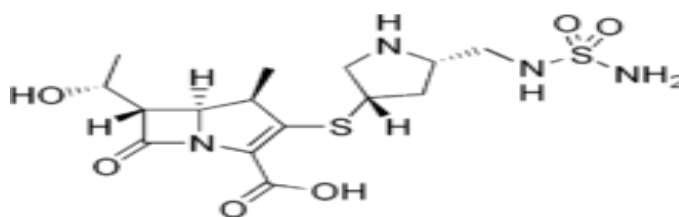
ارتاپنم، آنتی بیوتیک جدید تر، کارباپنم، در شرایط آزمایشگاهی فعالیت خوبی را علیه ارگانیزم های تولید کننده ESBL نشان می دهد. با از دست دادن پورین غشای خارجی، باکتری ها نسبت به این داروها



Ertapenem

مقاوم می شوند [۱۴۷].

دوری پنم، یک کارباپنم نسل جدید است که به وسیله FDA برای استفاده بالینی در عفونت های داخل شکمی پیچیده و عفونت های دستگاه ادراری پیچیده مجوز گرفته است [۱۴۷].



Doripenem

۱-۱۵-۴ بتالاکتام های مهارکننده بتالاکتاماز

از گروه بتالاکتام ها، سه مهارکننده آنزیم های بتالاکتاماز وجود دارد که عبارتند از: کلاولانیک اسید، سولباکتام و تازوباکتام. ترکیبات پنی سیلین و آنالوگهای آن که در حال حاضر در دسترس می باشند شامل آمپی سیلین / سولباکتام، آموکسی سیلین / کلاولانیک اسید، تیکارسیلین / کلاولانیک اسید و پی پراسیلین / تازوباکتام است. این عوامل، ذاتاً "فعالیت ضدباکتریایی کمی دارند و به عنوان مهارکننده بتالاکتامازها عمل می کنند، اما در ترکیب با آنتی بیوتیک های بتالاکتامی که به هیدرولیز توسط بتالاکتامازها حساس می باشند می توانند در برابر تجزیه شدن آنها را محافظت نموده و به آنها اجازه دهند تا اثر کشندگی خود را اعمال نمایند. برای اینکه یک مهارکننده بتالاکتاماز موثر باشد، بایستی حلقه بتالاکتامی داشته باشد که بتواند تحت

تأثیر حمله آنزیمی قرار گرفته و یک واسطه آنزیم آسیل را تشکیل بدهد. این ترکیب واسطه با سرعت نسبتاً آهسته ای هیدرولیز می شود و بدین ترتیب با خاصیت suicide inhibite مانع هیدرولیز آنتی بیوتیک های بتالاکتام می شود. علاوه بر این، در ارگانسیم های گرم منفی داشتن توانایی عبور از ورای کانال های پورین، نقش اساسی دارد. توانایی عبور آنتی بیوتیک موجب تولید غلظت های نسبتاً بالایی از آنتی بیوتیک در فضای پری پلاسم می شود، به این ترتیب، مقادیر زیادی از آنتی بیوتیک ها و مهار کننده ها برای مهار بتالاکتامازها حاصل می گردد و به آنتی بیوتیک های بتالاکتامی که به این ترتیب حفاظت شده است امکان می دهد تا قبل از هیدرولیز شدن، پروتئین های متصل شونده به پنی سیلین را غیرفعال کند [۱۴۹-۱۳۶ و ۱۲].

اسیدکلاولانیک اولین مهارکننده بتالاکتاماز می باشد. این آنتی بیوتیک از جهاتی با پنی سیلین متفاوت است که عدم وجود زنجیره جانبی روی حلقه بتالاکتام، وجود اتم اکسیژن به جای اتم سولفور و جانشینی Hydroxyethylidene روی حلقه اگرالدین از جمله تفاوت این عامل با پنی سیلین ها می باشد. مهارکنندگان دیگر مثل سالباکتام و تازوباکتام، سولفون های نیمه سنتتیک و پنی سیلانیک اسید می باشند که هر سه ترکیب فعالیت ضد میکروبی دارند. این آنتی بیوتیک ها در ترکیب با آنتی بیوتیک های آموکسی سیلین، پیپراسیلین، مزوسیلین و سفوپرازون مورد استفاده قرار می گیرند و فعالیت این دارو را در مقابل سویه های تولید کننده بتالاکتاماز، استافیلوکوک ها، گونوگوک ها،^{۲۱۲} هموفیلوس آنفلونزه،^{۲۱۳} موراکسلا کاتارالیس،^{۲۱۴} باکترئیدز، گونه های *Klebsiella* و *E. coli* افزایش می دهند [۱۴۹]. بتالاکتامازهای TEM وابسته به پلاسمید در سویه های مقاوم به سفنازیدیم *K. pneumoniae* و *E. coli* با این عامل غیرفعال می شوند، در حالی که بتالاکتامازهای قابل القاء (کلاس یک کروموزومی) در Ampc

^{۲۱۲} *Gonegococcus*
^{۲۱۳} *Haemophilus Influenzae*
^{۲۱۴} *Moraxella Catarrhalis*

بتالاکتاماز آنتروباکتر، سیتروباکتر، سراشیا و سویه های سودموناس با کلاولانیک اسید مهار نمی شوند. در بسیاری از باکتری ها، سولباکتام به عنوان یک مهار کننده موثر بتالاکتامازهای وابسته به پلاسمید و کروموزومی می باشد. این دارو در مقابل ارگانسیم هایی که به دلیل تولید بتالاکتاماز در مقابل بتالاکتام ها مقاوم می باشند، با پنی سیلین ها و سفالوسپورین ها به طور سینرژیک عمل می کند. تازوباکتام به عنوان یک suicidal beta- lactamase inhibitor عمل می کند و به PBP-1 و PBP-2 متصل شده و به تنهایی فعالیت ضد باکتریایی بسیار ضعیفی دارد [۱۶۳ و ۱۳۸]. تازوباکتام، فعالیت خوبی در مقابل بتالاکتامازهای پلاسمیدی طیف گسترده دارد ولی در مقابل بتالاکتامازهای کروموزومی قابل القاء آنتروباکتریاسه ها فعالیت ضعیفی دارد [۱۳۸].

۱-۱۵-۴-۵ منوباکتام ها

منوباکتام ها یک حلقه ی بتالاکتام مونو سیکلیک دارند. آزترونام مهم ترین داروی این خانواده است. آزترونام اولین منوباکتامی است که در سال ۱۹۹۸ در طب نوزادان توسط USFDA^{۲۱۰} مجوز استفاده را دریافت کرد. مکانیسم عمل این دارو شبیه پنی سیلین و سفالوسپورین بوده و ترجیحاً با اتصال به PBP-3 در باکتری های گرم منفی باعث لیز و مرگشان خواهد شد [۱۲]. در مقایسه با ایمپنم، آزترونام طیف ضد میکروبی محدودی دارد. آزترونام در برابر بسیاری از بتالاکتامازهای باکتری های گرم منفی مقاوم است اما توسط ESBLها غیر فعال می شود [۱۴۶-۱۴۵].

۱-۱۵-۴-۶ سفامایسین ها

سفامایسین ها بسیار مشابه سفالوسپورین ها هستند، به جز اینکه آن ها دارای اکسیژن در جایگاه گوگرد در حلقه هیدروتیازین می باشند. که سبب می شود، در برابر هیدرولیز بتالاکتاماز پایدارتر باشند. همانند پنی

^{۲۱۰} US Food and Drug Administration

سیلین ها دارای مکانیسم عمل مشابهی هستند با این حال آن ها دارای طیف ضد باکتریایی وسیع تری هستند و به بسیاری از بتالاکتامازها مقاومند و دارای ویژگی های فارماکوکینیتیک (مثلا نیمه عمر طولانی تر) بهتری می باشند. تغییرات بیوشیمیایی در مولکول پایه آنتی بیوتیک منجر به ایجاد آنتی بیوتیک هایی با خصوصیات فارماکوکینیتیک و فعالیت بهتری می گردد.مانند: سفوتتان و سفوکسیتین، علیه گنوکوک ها موثر هستند و سف متازول، این گروه بر روی باکترئیدیس فرازیلیس موثر است [۱۴۶-۱۴۵ و ۱۲].

۱-۱۶ مکانیسم عمل ضد میکروبی آنتی بیوتیک های بتالاکتام

دیواره سلولی شامل یک پلیمر پیچیده موکئیدی است که از واحدهای منظم قندی، N استیل مورامیک اسید و N استیل گلوکز آمین تشکیل شده اند. زنجیره های کوتاه پپتیدی به قندهای آمینی می چسبند سرانجام اتصال جانبی زنجیره های پپتیدی (مثلاً توسط پنتا گلیسین که ناشی از واکنش های ترانس پپتیداسیون توسط آنزیم هامی باشند)، موجب استحکام دیواره سلولی می شود. تمام آنتی بیوتیک های خانواده بتالاکتام مهارکننده ی انتخابی سنتز دیواره سلولی باکتری ها هستند و در نتیجه علیه باکتری ها مؤثر می باشند.اولین مرحله اتصال آنتی بیوتیک به گیرنده سلولی PBP است که به تعداد سه تا شش PBP وجود دارد. بعضی از آن ها آنزیم های ترانس پپتیداز هستند. گیرنده های مختلف تمایل متفاوتی در اتصال به یک دارو دارند و هر کدام می توانند اثر متفاوتی داشته باشند. به عنوان مثال چسبیدن پنی سیلین به یک PBP ممکن است عمدتاً به طویل شدن غیر طبیعی سلول منجر شود، در حالی که چسبیدن به PBP دیگر ممکن است سبب ایجاد اختلال در غشای سلول و در نتیجه متلاشی شدن سلول گردد. PBP تحت کنترل ژن های کروموزومی هستند و جهش می تواند تعداد آن ها و قابلیت اتصال آن ها به آنتی بیوتیک های بتالاکتام را تغییر دهد. پس از اینکه یک بتالاکتام به یک یا چند گیرنده چسبید، واکنش ترانس پپتیداسیون مهار می شود و سنتز پپتیدوگلیکان متوقف می گردد. مرحله بعدی غیر فعال شدن یک مهار

کننده آنزیم های اتولیتیک در دیواره سلولی است. این مسئله سبب می شود که آنزیم های لیز کننده فعال شوند و سلول در شرایطی که محیط ایزوتونیک است، متلاشی شده و در محیط هیپر تونیک، سلول به پروتوپلاست و اسفروپلاست تبدیل گردد. مهار آنزیم های ترانس پپتیداسیون توسط پنی سیلین ها و سفالوسپورین ها ممکن است به علت شباهت ساختمان این داروها با آسیل D-آلانین D-آلانین باشد. واکنش های ترانس پپتیداسیون، باعث حذف یک D - آلانین از پنتا پپتید می گردد [۱۲].

۱۷-۱ مقاومت دارویی در اشریشیا کلی

مکانیسم مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک در *E.coli* ناشی از مکانیسم های : مقاومت ناشی از کاهش نفوذپذیری دیواره سلولی، پمپ های افلاکس، تغییر در محل اثر آنتی بیوتیک ها (تغییر در مولکول هدف)، مقاومت ناشی از تولید آنزیم های غیر فعال کننده [۱۶۸-۱۳۸].

۱۷-۱-۱ مقاومت ناشی از کاهش نفوذپذیری دیواره سلولی

بسیاری از باکتری های گرم منفی به دلیل غشاهای خارج سلولی (پورین) از ورود مواد به درون سلول جلوگیری کرده و با کاهش نفوذ پذیری غشاهای بیرونی خود نسبت به این مواد مقاومت نشان می دهند. پورین های موجود در غشاء به ویژه پورین F شاخص اصلی نفوذ پذیری غشاء می باشند. آمینو گلیکوزیدها با جایگزینی پورین های Mg^{++} پیوند های عرضی LPS را تخریب کرده، در صورتیکه بتا لاکتام ها و کینولون ها از پورین های غیر اختصاصی عبور می کنند. از دست دادن پورین های غشاء خارجی به نام oprD (با نام اولیه پورین D_2) سبب مقاومت به ایمپنم و کاهش حساسیت به مروپنم می شود [۱۶۴].

۱۷-۱-۲ پمپ های افلاکس

مکانیسم تراوشی آنتی بیوتیک ها که در آن دارو به صورت فعال از دیواره سلولی به بیرون پمپ می شود این مکانیسم اولین بار در اشیریشیا کلی مقاوم به تتراسایکلین توصیف شد. این پروتئین ها آنتی بیوتیک را از محیط داخل سلول باکتری به بیرون انتقال می دهند. علاوه بر آن از دیگر عملکرد های این پمپ ها در باکتری ها می توان جذب مواد غذایی ضروری و یون ها، دفع مواد زائد و ارتباط باکتری با محیط را نام برد [۱۶۵].

۱-۱۷-۳ تغییر در محل اثر آنتی بیوتیک ها (تغییر در مولکول هدف)

این مکانیسم بدین صورت است که در مولکول هدف یا جایگاه هدف آنتی بیوتیک تغییر ایجاد شده و مانع از اتصال آنتی بیوتیک به هدف می شود [۱۶۶]. به عنوان مثال تغییر میل ترکیبی در یک یا چند PBP و هر گونه جهشی در ساختار PBP، ممکن است مانع اتصال آن به آنتی بیوتیک گردد. گاهی به علت موتاسیون در ژنوم باکتری ها اهداف آنتی بیوتیکی دچار تغییر شده و اثر آن ها خنثی می شود. تغییر در پروتئین های غشاء نیز می تواند منجر به مقاومت گردد. تغییر در ساختار زیر واحد S ۳۰ ریبوزومی باعث مقاومت به استرپتومایسین می گردد. موتاسیون در توالی امینو اسیدی PBP، به عنوان مثال مقاومت اشیریشیاکلی به سفالکسین [۱۵۰].

۱-۱۷-۴ مقاومت ناشی از تولید آنزیم های غیر فعال کننده

به طور کلی تولید آنزیم های غیر فعال کننده توسط باکتری به دو دسته تقسیم می شود ۱- بتالاکتامازها که آنتی بیوتیک های بتالاکتام را تخریب می کنند ۲- آنزیم های تغییر دهنده آنتی بیوتیک ها نظیر آنزیم هایی که ماکرولیدها و آمینوگلیکوزیدها را تغییر می دهند و باعث ناکارآمدی آنتی بیوتیک ها می شوند [۱۶۷]. بتالاکتامازها آنزیم هایی هستند که سبب تخریب آنتی بیوتیک های بتالاکتام می شوند. در حال حاضر

بیش از ۵۰۰ نوع مختلف از بتالاکتامازها گزارش شده است. این تنوع آنزیم های بتالاکتاماز هم در باکتری های گرم منفی و هم در باکتری های گرم مثبت مشاهده می شود. بتالاکتامازهای تولید شده توسط باکتری های گرم مثبت به محیط اطراف باکتری آزاد می شوند اما باکتری های گرم منفی این آنزیم ها را در فضای پری پلاسمی خود رها می کنند. بنابراین باکتری های گرم مثبت محافظت گروهی برای دیگر باکتری های موجود در محیط ایجاد می کنند در حالیکه باکتری های گرم منفی محافظت اختصاصی را در باکتری وجود می آورد. بتالاکتامازها خیلی قبل تر از معرفی پنی سیلین ها وجود داشته اند و ژن های کد کننده اجداد این آنزیم ها به طور طبیعی بر روی کروموزوم باکتری ها قرار داشتند. در سال ۱۹۶۵ اولین مورد بتالاکتاماز های کد شده توسط پلاسمید در باکتری های گرم منفی در کشور یونان گزارش شد و بدنبال آن باکتری های تولید کننده بتالاکتاماز افزایش پیدا کرده و عامل ایجاد کننده عفونت های شدید شدند [۱۶۸]. مقاومت بیوشیمیایی (در برابر آنتی بیوتیک های بتا لاکتام) ممکن است در ارتباط با چهار مکانیسم مجزا باشد: الف) مقاومت ناشی از تولید آنزیم های غیر فعال کننده ب) تغییر جایگاه هدف ج) ممانعت از انتقال دارو به درون سلول (کاهش نفوذ پذیری آنتی بیوتیک) د) پمپ های افلاکس^{۲۱۶}. بدون توجه به اینکه مقاومت در برابر پنی سیلین به طور طبیعی و ذاتی اتفاق بیافتد و یا در بدن موجود زنده کسب گردد، غیرفعال شدن پنی سیلین توسط بتا لاکتامازها صورت می پذیرد. بتالاکتامازها، حلقه بتالاکتام پنی سیلین ها و سفالوسپورین ها را در میان اتم های کربن و نیتروژن می شکنند و ترکیب غیرفعالی را به وجود می آورند [۱۴۹-۱۴۸ و ۱۳۸].

۱-۱۷-۵ مکانیسم مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک در *E.coli*

۱-۱۷-۵-۱ مکانیسم مقاومت نسبت به پنی سیلین ها:

اولین مکانیسم مقاومت نسبت به پنی سیلین ها، هیدرولیز آنزیمی حلقه بتالاکتام توسط آنزیم های بتالاکتاماز می باشد. بتالاکتامازهای باکتری های گرم مثبت قابل تحریک هستند و تمایل بسیار زیادی برای سوبستراهای خود دارند. همچنین آنها خارج سلولی بوده و در مقادیر نسبتاً زیادی تولید می شوند. زمانی که ارگانیزم ها در معرض پنی سیلین ها قرار می گیرند مقدار بسیار زیادی از آنزیم را به محیط اطراف خود می ریزند تا تمام داروی موجود در محیط اطرافشان را تخریب نمایند [۱۴۹-۱۴۸ و ۱۳۶]. ولی در باسیل های گرم منفی بتالاکتامازها در فضای پری پلاسمیک ما بین غشاء سلولی داخلی و خارجی واقع شده اند: مولکول های پنی سیلین که از غشاء خارجی عبور می کنند می توانند قبل از رسیدن به محل عمل خود، با بتالاکتاماز در تماس قرار گیرند. اگرچه به نظر می رسد همه باکتریهای گرم منفی حاوی آنزیم بتالاکتاماز باشند ولی به طور قابل توجهی تیپ و مقدار این آنزیم ها در باکتریها با همدیگر تفاوت دارند. این آنزیم ها می توانند وابسته به کروموزوم و یا پلاسمید، یا جزئی از ساختار باکتری ها و یا القایی باشند و فقط در مقابل دسته خاصی از داروهای بتالاکتام فعال باشند. توانایی پنی سیلین ها در مهار رشد باسیل های گرم منفی به میزان نفوذ از عرض غشاء خارجی^{۲۱۷} آنها بستگی دارد و تغییر در زنجیره جانبی پنی سیلین ها سبب افزایش فعالیت این داروها روی باکتری های گرم منفی می گردد [۱۳۸]. پخش بتالاکتامازهای وابسته به پلاسمید نظیر TEM-1 در آنتروباکتریاسه ها، هموفیلوس آنفولانزا و نایسریاگونوره، به شدت حساسیت نسبت به پنی سیلین ها را تغییر می دهد. پنی سیلین ها به وسیله بتالاکتامازهای طیف گسترده جدیدتری (ESBLs) غیرفعال می شوند. مکانیسم دیگر مقاومت نسبت به پنی سیلین ها که اهمیت فوق العاده ای دارد، تغییر در ناحیه هدف می باشد. کاهش گرایش PBP به پنی سیلین ها، از جانشینی آمینواسیدها و جایگذاری آنها در PBP حاصل می شود. این تغییر یا کاهش گرایش، سبب بروز مقاومت به متی سیلین در استافیلوکوکوس اورئوس و بروز مقاومت به پنی سیلین در استرپتوکوکوس پنومونیه و نایسریا گونوره

شده و در ارتباط با پروتئین های متصل شونده به پنی سیلین به صورت متفاوتی دیده شده است. تغییر در نفوذپذیری غشاء خارجی باسیل های گرم منفی یک مکانیسم دیگر مقاومت به پنی سیلین ها می باشد. موتانت هایی با کاهش پورین و یا تغییر در پورین، ۲ تا ۱۶ برابر MIC بالاتر را در مقابل پنی سیلین های طیف گسترده نشان می دهد. بیان بیش از حد پمپ Efflux، مثل MeXAB-opr در سودوموناس آئروجینوزا، نیز سبب ایجاد مقاومت می گردد. با این وجود، در اغلب نمونه های بالینی مقاوم، کاهش نفوذپذیری Efflux همراه با تغییر PBP ها و یا تولید بتالاکتاماز قابل القاء، اتفاق می افتد [۱۴۸ و ۱۳۸].

۱-۱۷-۵-۲ مکانیسم مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های بتالاکتام منوسا یکلک:

آزترونام با بتالاکتامازهای وابسته به پلاسمید بسیار شایع از جمله آنزیم های SHV-1, TEM-2, TEM-1 موجود در بسیاری از آنتروباکتریاسه ها، به سرعت هیدرولیز نمی شود. با وجود این، آنزیم هایی وجود دارند که مقاومت نسبت به آزترونام را به باکتری القاء می نمایند. اگرچه، بسیاری از آنتروباکتریاسه ها و سودوموناس آئروجینوزا با آزترونام از بین می روند، اما این باکتری ها مقادیر کمی از سفالوسپورینازهای *AmpC* کروموزومی را تولید می کنند. تولید مقدار زیاد آنزیم های *AmpC* در موتانت های دپرس شده، مقاومت نسبت به آزترونام و اغلب بتالاکتام های دیگر را فراهم می سازد [۱۳۸ و ۱۵۰]. حرکت *AmpC* کروموزومی به پلاسمید و سپس انتشار آنها به *K. pneumoniae* و *E. coli* و همین طور سایر اعضاء خانواده آنتروباکتریاسه ها طرح دیگری از مقاومت می باشد که کارایی آزترونام را تهدید می کند. سویه های باکتریایی که *AmpC* کد شونده توسط پلاسمید را به دست می آورند مقاومت به آزترونام و اغلب آنتی بیوتیک های بتالاکتام دیگر را کسب می نمایند [۱۵۱]. همچنین ظهور تدریجی بتالاکتامازهای با طیف وسیع، نوع دیگری از مقاومت می باشد که کارایی آزترونام را تهدید می کند. اغلب ESBL ها، مشتقات آنزیم های قدیمی تر کد شونده پلاسمیدی هستند همچون TEM و SHV هستند، که ناحیه فعال آنها دچار موتاسیون شده و باعث

هیدرولیز بیشتر آزترونام و سفالوسپورین های طیف گسترده، مثل سفنازیدیم و سفوتاکسیم در آنها شده است. این آنزیم ها ابتدا در کلبسیلا پنومونیه و *E.coli* شناخته شدند. و سپس این آنزیم ها در دیگر جنس های آنتروباکتریاسه ها و درکاپنوسیتوفاگ ها،^{۲۱۸} بورخدرلیا سپاسیا^{۲۱۹} و *P. aeruginosa* شناسایی شده اند. علاوه بر ESBL های مشتق شده از TEM و SHV تیپ های دیگری از ESBL ها از جمله فامیل های PER و OXA و CTX-M وجود دارد [۱۵۲]. همچنین موتانت های آزمایشگاهی با حساسیت کمتر نسبت به آزترونام نیز گزارش شده اند که از طریق مکانیسم های غیر آنزیمی سبب مقاومت می گردند. اغلب در این موتانت ها کاهش نفوذپذیری نسبت به دارو نشان داده شده است [۱۴۹].

۱-۱۷-۵-۳ مکانیسم مقاومت نسبت به کارباپنم ها:

مکانیسم های اصلی مقاومت به کارباپنم ها در *E.coli* عبارتند از: I - مکانیزم تولید آنزیم های هیدرولیز کننده ی کارباپنم ها (کارباپنمازها) که شامل ۱- متالو بتالاکتامازهای کلاس B (MBLs)^{۲۲۰} - بتالاکتامازهای کلاس A که با کلاولانیک اسید مهار شده و تحت کنترل پلاسמיד می باشند. مانند کارباپنماز های کلبسیلا پنومونیه (KPC)^{۲۲۱} و (GES)^{۲۲۲} ۳- بتالاکتامازهای با طیف گسترده کلاس D، اکساسیلیناز هایی مانند (OXA-48)^{۲۲۳} است. II - مکانیزم کاهش نفوذپذیری به دلیل از دست دادن پورین هاویاز دست دادن پروتئین های غشاء خارجی (OmpS، OmpC، OmpF) و یا مکانیسم های ترکیبی چون کاهش نفوذپذیری و تولید زیاد برخی از بتا لاکتامازها همچون AmpC بتا لاکتامازها و برخی ESBLs. III - وجود سیستم پمپ افلاکس دارو به خارج از باکتری می باشد [۱۵۳-۱۵۷]. کارباپنم ها، القاء کنندگان

^{۲۱۸} *Capnocytophaga*
^{۲۱۹} *Burkholderia cepacia*
^{۲۲۰} Metallo-β-Lactamases
^{۲۲۱} *Klebsiella Pneumoniae Carbapenemase*
^{۲۲۲} Guiana Extended- Spectrum
^{۲۲۳} Extended Spectrum oxacillinases

قوی آنزیم های گروه Bush-1 و متالوبتالاکتامازهای کروموزومی استنوتروفوموناس مالتوفیلا^{۲۲۴} و آئروموناس هیدروفیلا^{۲۲۵} هستند و به همین دلیل از استفاده توام کاربایم ها و آنتی بیوتیک های بتالاکتام دیگر باید خودداری نمود زیرا پدیده آنتاگونیسم اتفاق می افتد [۱۴۹]. کاربایمها گروه پراکنده ای از آنزیم ها می باشند و در حال حاضر معمول نبوده ولی توجه زیادی را به خود جلب کرده اند، زیرا این آنزیم ها نه تنها در برابر اکسی ایمینو-سفالوسپورین ها و سفاماسین ها فعال هستند بلکه در مقابل کاربایم ها نیز فعال می باشند [۱۵۸]. در سال ۱۹۹۰ کاربایمها تیپ IMP وابسته به پلاسمید هم در باکتریهای روده ای و هم در سودوموناس و آسیتوباکتر گزارش شده است و اخیراً "هفده نوع از آنها شناخته شده است. در سال ۱۹۹۷ آنزیم های IMP در اروپا، کانادا و برزیل مشاهده شده و به آرامی به سایر کشورهای شرق دور پخش شده است [۱۵۹]. در سال ۱۹۹۹ در ایتالیا خانواده VIM، دومین گروه مشتق شده از کاربایمها گزارش شد [۱۶۰-۱۶۲]، که از نظر انتشار جغرافیایی در اروپا، آمریکای جنوبی، شرق دور و در ایالات متحده مشاهده شده است. آنزیم های دسته A بخصوص آنزیم های KPC وابسته به پلاسمید نیز کاربایمها تیپ موثری هستند که شناخته شده است [۱۶۰]. در نهایت برخی از آنزیم های بتالاکتاماز OXA با فعالیت کاربایمها تیپ به نمونه های بالینی اضافه شده است که در سایر مکانیسم های مقاومت همانند تغییر در نفوذپذیری نیز نقش دارند [۱۶۲].

۱-۱۸ کسب و انتشار مقاومت آنتی بیوتیکی در بین باکتری ها

مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری ها ممکن است ذاتی باشد که به طور طبیعی منجر به مقاومت می گردد یا ممکن است اکتسابی به واسطه موتاسیون در توالی نوکلئوتیدی یا کسب مقاومت از طریق عناصر ژنتیکی متحرک رخ دهد [۱۶۷]. یا ممکن است مقاومت فیزیولوژیکی باشد. مقاومت فیزیولوژیکی مقاومتی است

^{۲۲۴} *Stenotrophomonas maltophilia*
^{۲۲۵} *Aeromonas hydrophila*

که در شرایط خاصی از رشد ظاهر می شود. مانند ایجاد بیوفیلیم، پاتوژن در بیوفیلیم محبوس کرده و از تخریب آنتی بیوتیکی در امان می مانند. مکانیسم این پدیده دقیقاً مشخص نیست. احتمال آن می رود که وجود بیوفیلیم پلی ساکارییدی، میزان و سرعت نفوذ آنتی بیوتیک ها به داخل میکروارگانیسم را کاهش می دهد یا سیستم ژنتیکی خاصی که مسئول مقاومت فیزیولوژیکی است، در شرایط تولید بیوفیلیم فعال شود که در شرایط قبلی غیر فعال بوده است. از سوی دیگر، گروهی از آنتی بیوتیک ها مانند بتالاکتام ها، برای تأثیر گذاری نیاز به رشد باکتریایی سریع دارند که این برخلاف حالتی است که باکتری در شرایط بیوفیلیم دارد [۱۶۸]. مقاومت اکتسابی می تواند در اثر جهش نقطه ای، حذف، معکوس شدن یا جایگزین شدن ژن یا در اثر انتقال خطی آن رخ دهد. این انتقال خطی یا جهش، در ژن هایی رخ می دهد که به بقای بیشتر میکروارگانیسم کمک می کند؛ مانند تغییر در شدت بیماری زایی یا تغییر در مقاومت به آنتی بیوتیک ها. تغییر ژنتیکی می تواند به روش های زیر بروز نماید: I کاهش ورود دارو به درون میکروارگانیسم در اثر جهش پورین های غشای خارجی. II افزایش برون ریز دارو در اثر افزایش پمپ های مربوطه. III تغییر یا غیر فعال شدن محل اثر دارو در اثر موتاسیون در پروتئین های ریبوزومی، پروتئین های متصل شونده به پنی سیلین ها و Rrna. IV ایجاد تغییر در ساختار آنتی بیوتیک ها مانند تغییر آمینو گلیکوزیدها به واسطه آنزیم های تغییر دهنده و هیدرولیز آنتی بیوتیکها با آنزیم های بتالاکتاماز وسیع الطیف [۱۵۱].

۱-۱۹ فاکتورهای مؤثر در گسترش و انتشار مقاومت های آنتی بیوتیکی

این فاکتورها به سه گروه تقسیم می شوند :

۱- انتقال ژن های مقاومت از یک باکتری به باکتری دیگر که از طریق کانژوگاسیون، ترانسداکشن و

ترانسفورماسیون اتفاق می افتد.

۲- جهش در ژن های مسئول مقاومت.

۳- افزایش فشار محیطی که منجر به انتقال پلاسمیدها می شود. پلاسمیدها می توانند به صورت درون گونه یا بین گونه ای انتقال یابند و در نتیجه علاوه بر سلول مادر از سایر باکتری ها نیز کسب شوند [۱۶۹].

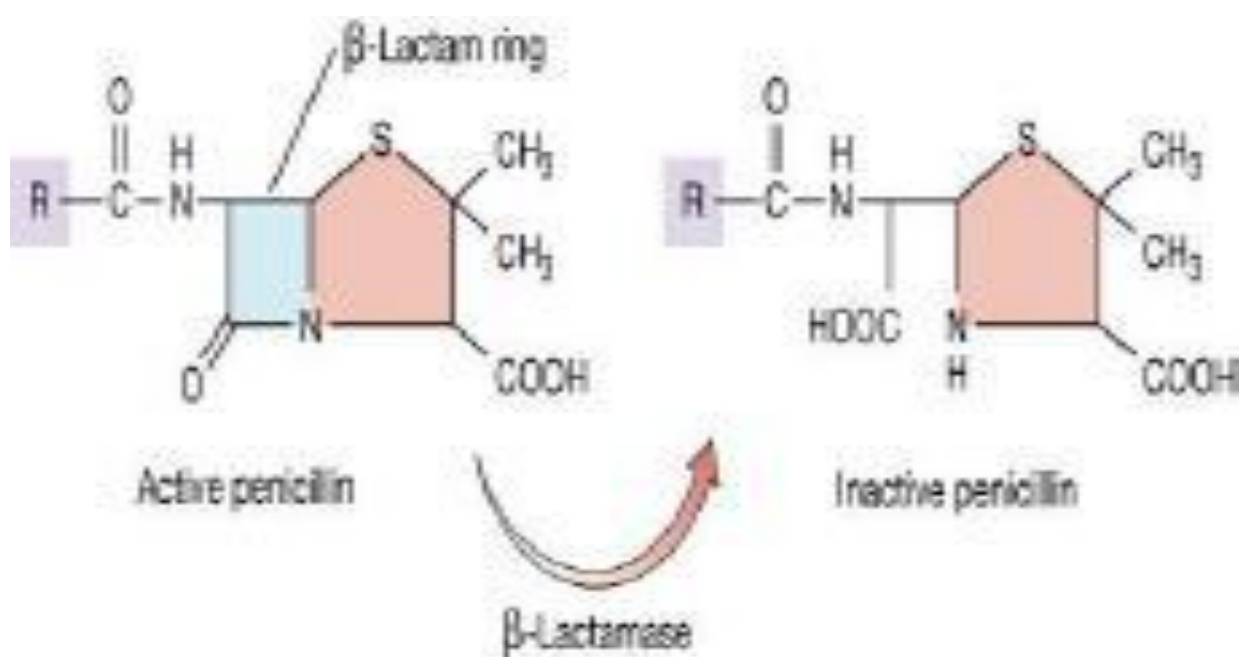
۲۰-۱ بتالاکتامازها

اولین بتالاکتاماز در اشریشیا کلی شناسایی شد. این بتالاکتاماز پنی سیلین را هیدرولیز می کرد [۱۷۰]. TEM-1 اولین بتالاکتاماز به واسطه پلاسمید در ارگانیزم های گرم منفی می باشد. [۱۳۷]. بدنبال آن باکتری های تولید کننده بتالاکتاماز افزایش پیدا کرده و عامل ایجاد کننده عفونت های شدید شدند [۱۷۱]. بتالاکتامازها گروهی از آنزیم ها هستند که قادرند حلقه بتالاکتام آنتی بیوتیک های دارای حلقه بتالاکتام را هیدرولیز کنند. تولید بتالاکتامازها، اصلی ترین مکانیسم مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های بتالاکتام می باشد و بتالاکتامازهای مختلفی در طبیعت یافت می شوند. بتالاکتامازها به وسیله ژن های واقع شده بر روی پلاسمیدها، ترانسپوزان ها و کروموزوم های باکتریایی یافت می شوند. بتالاکتامازها در ارگانیزم های گرم مثبت و گرم منفی حضور دارند [۱۴۸ و ۱۳۸].

بتالاکتامازهای کروموزومی می توانند به طور القایی یا به طور ساختمانی بیان شوند و زمانی که این ژن ها در باکتری های گرم منفی بر روی پلاسمید واقع شوند، این آنزیم ها به طور ساختمانی بیان می شوند و امکان دارد یک باکتری چندین بتالاکتاماز داشته باشد [۱۷۳]، اما بتالاکتامازهای باکتریهای گرم مثبت قابل تحریک هستند و تمایل بسیار زیادی برای سوبستراهای خود دارند. آنها خارج سلولی بوده و در مقادیر نسبتاً زیاد تولید می شوند. در ارگانیزم های گرم مثبت تولید بتالاکتامازها با واسطه ژن های کروموزومی و پلاسمید است [۱۳۶]، بتالاکتامازها، پروتئین های گلوبولار^{۲۲۶} هستند که دارای ۱۱ هلیکس آلفا و پنج Beta

pleated sheet می باشند و تاکنون، ساختمان سه بعدی تعدادی از بتالاکتامازها تعیین شده است [۱۷۴]-

[۱۷۱].



شکل ۱-۱۵. شکسته شدن حلقه بتالاکتام توسط آنزیم های بتالاکتاماز [۱۷۱].

۱-۲۰-۱ طبقه بندی بتالاکتامازها

از آنجائیکه تنوع خصوصیات آنزیمی در بسیاری از بتالاکتامازها شناخته شده است، تلاش های بسیار زیادی جهت طبقه بندی این ارگانسیم ها از اواخر دهه ۱۹۶۰ نیز صورت گرفته است. این طبقه بندی ها عمدتاً به دو شکل می باشند الف- طبقه بندی بر مبنای خصوصیات بیوشیمیایی و عملکردی (Bush-Jacoby) ب- طبقه بندی بر مبنای ساختار مولکولی (Ambler) شکل ۱-۱۶. در مجموع بر اساس طبقه بندی بر مبنای عملکرد و ساختار مولکولی بتالاکتامازها را به ترتیب در چهار گروه (۴-۱) و زیر گروه های متعددی و چهار کلاس مولکولی (A-D) قرار دادند [۱۷۲].

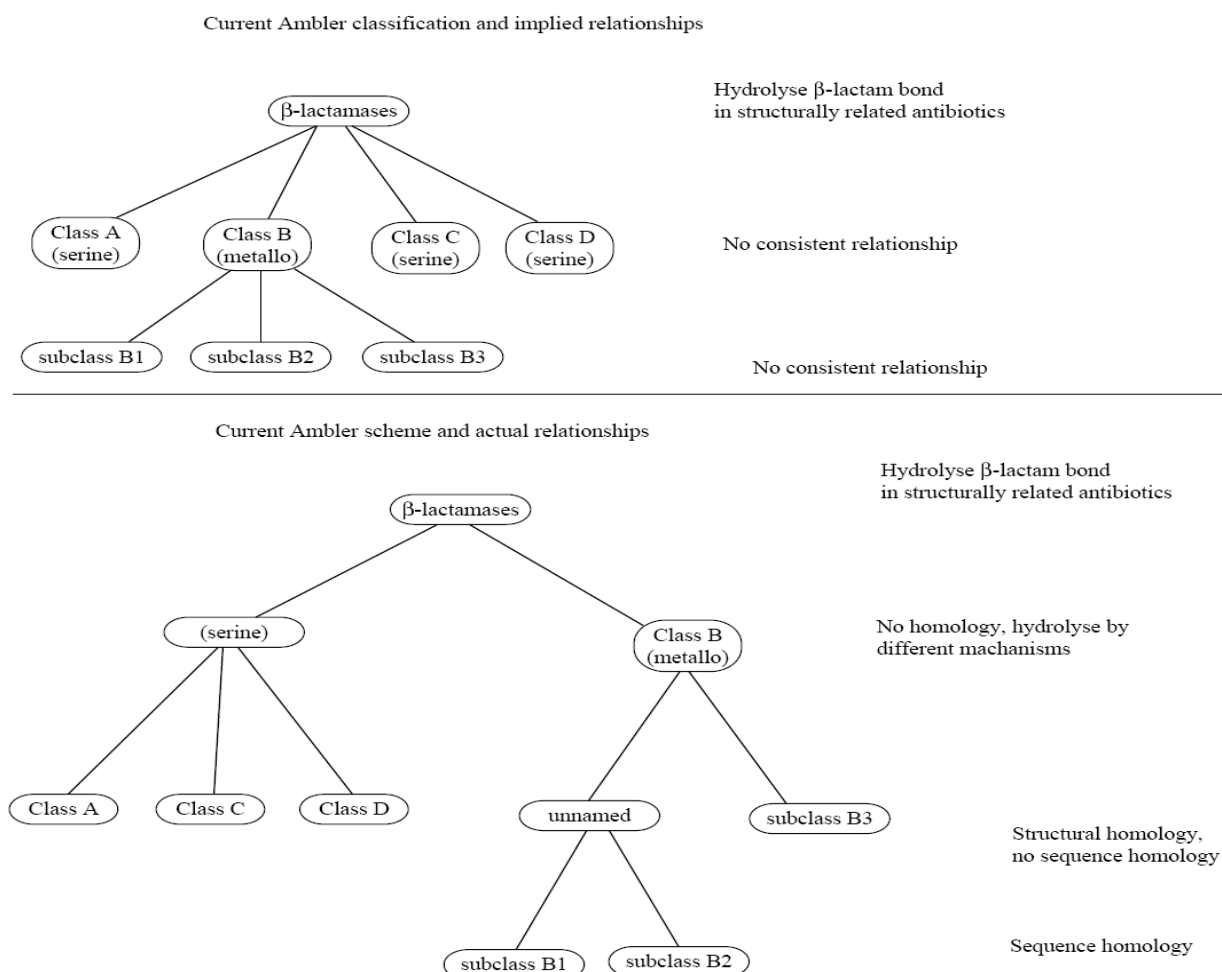


Figure 1. Schematic diagram of Ambler classification system.

شکل ۱-۱۶. شکل شماتیک از سیستم طبقه بندی آمبلر

گروه ۱: این گروه از بتالاکتاماز ها طبقه بندی بر اساس خصوصیات بیوشیمیایی و عملکردی (طبقه بندی Bush-Jacoby) سفالوسپوریناز بوده و در کلاس C مولکولی قرار دارند. این گروه توسط مهار کننده بتالاکتاماز (کلاولانیک اسید) مهار نمی شوند. آنزیم های مرتبط با این گروه AmpC بتالاکتامازها می باشند. AmpC ها جزء آنزیم های گروه یک وابسته به پلاسمیدی هستند. ACT، DHA، FOX، CMY، MIR و سایر آنزیم ها از سال ۱۹۸۹ شناخته شده اند. اما این آنزیم ها نسبت به گروه 2be که همان بتالاکتامازهای وسیع الطیف ESBL ها هستند شیوع کمتری دارند [۱۷۲].

زیرگروه ۱e: واریانت های گروه ۱ هستند که فعالیت زیادی روی سفتازیدیم و سایر اکسی ایمینوبتالاکتام ها دارند. به دلیل حذف، جانشینی یا الحاق در آمینواسیدها ایجاد می شوند. این آنزیم ها به عنوان AmpC های وسیع الطیف شناخته شده اند. آنزیم های پلاسمیدی شامل CMY-10، CMY-19، CMY-37، GC1 و... هستند [۱۷۲].

گروه ۲: شامل پنی سیلیناز و سفالوسپوریناز که هر دو توسط کلاولانیک اسید مهار شده و متعلق به کلاس A و D از طبقه بندی مولکولی می باشند. ESBL ها در این گروه قرار داشته و ژن های شایع در این گروه TEM و SHV می باشد. بدلیل افزایش در زیرتیپ های TEM و SHV بتالاکتامازها این گروه را به ۲ زیر گروه ۲a و ۲b تقسیم کرده اند [۱۷۲].

زیر گروه ۲a: همان پنی سیلیناز ها هستند که از نظر ملکولی در کلاس A هستند. گروه کوچکی از بتالاکتامازها را تشکیل می دهند. این آنزیم ها قادر به هیدرولیز بنزیل پنی سیلین ها و بسیاری از مشتقات پنی سیلین هستند [۱۷۶].

زیر گروه ۲b: برخلاف زیر گروه ۲a، این زیرگروه بتالاکتامازهای باطیف گسترده هستند بدین معنی که توانایی غیر فعال کردن پنی سیلین ها و سفالوسپورین ها را به یک نسبت دارند. تقسیم بندی های جدیدی در این زیر گروه صورت گرفته است که شامل گروه ۲be می باشد که بتالاکتامازهای با طیف گسترده که متعلق به کلاس مولکولی A می باشند. اضافه شدن e به آخر ۲b بیانگر فعالیت با طیف گسترده یا ESBL است که توانایی غیر فعال کردن سفالوسپورین های نسل سوم (سفتازیدیم، سفوتاکسیم، سفودوکسیم) و همچنین آزترونام را دارند [۱۷۲].

گروه ۲br: مقاوم در برابر مهارکننده های بتالاکتاماز و در کلاس A قرار دارند. R آخر آن بیانگر کاهش باند شدن کلاولانیک اسید و سولباکتام به این بتالاکتامازها می باشد. همچنین آنها را مشتقات TEM مقاوم

به مهارکننده ها می نامند، با این حال به طور معمول هنوز به تازوباکتام حساس هستند به جز آنزیم هایی که جایگزینی اسید آمینه در موقعیت 69 met وجود داشته باشد [۱۷۲].

زیر گروه ۲ber: این بتالاکتامزهای وسیع الطیف شامل آنزیم های TEM هستند که نسبت به مهار با کلاولانیک اسید مقاومت نشان می دهند. این آنزیم ها همچنین به عنوان کمپلکس موتانت TEM(CMT) در نظر گرفته می شوند [۱۷۲].

زیر گروه ۲c: کاربنی سیلیناز و متعلق به کلاس A، به دلیل توانایی غیر فعال کردن کاربنی سیلین ها نسبت به بنزیل پنی سیلین ها در زیر گروه مجزایی قرار گرفتند. همچنین مقدار اندکی بر کلوگراسیلین تاثیر دارند [۱۷۲].

زیر گروه ۲ce: شامل کاربنی سیلیناز های وسیع الطیف CARB-10(RTG-4) هستند که اخیراً مورد شناسایی قرار گرفته اند و فعالیت گسترش یافته ای بر روی سفپیم و سفپروم دارند [۱۷۲].

زیر گروه ۲d: کلوگراسیلیناز ، متعلق به کلاس مولکولی D یا A. آنزیم هایی هستند که کلوگراسیلین را نسبت به بنزیل پنی سیلین بیشتر غیر فعال می کنند. این آنزیم ها به طور ضعیف توسط کلاولانیک اسید غیر فعال شده و بعضی از آنها جزء ESBL ها هستند. بیشتر اعضای خانواده OXA را در بر می گیرند [۱۷۲].

زیر گروه ۲de: این گروه دارای فعالیت بر روی اکسی ایمینو بتالاکتام ها هستند، در حالی که بر کارباپنم ها بی تاثیر هستند. بیشتر اعضای زیر گروه 2de از OXA-10 مشتق شده اند که بین اسید آمینه ۱ و ۹ جایگزینی صورت گرفته و شامل OXA-11 و OXA-15 هستند [۱۷۲].

زیرگروه 2df: آنزیم های OXA هستند که توانایی هیدرولیز کرباپنم ها را دارند. این آنزیم ها به طور شایع در اسیتوباکتر بومانی دیده می شوند که توسط ژن ها کروموزومی کد می شوند ولی با این حال آنزیم های پلاسمیدی OXA-23 و OXA-48 در انتروباکتریاسه نیز شناسایی شده اند [۱۷۲].

زیرگروه 2e: سفالوسپورینازهایی هستند که توانایی هیدرولیز سفالوسپورینازهای وسیع الطیف را دارند و توسط کلاولانیک اسید یا تازوباکتام مهار می شوند [۱۷۲].

زیر گروه 2f: سرین کرباپنماز هستند که مربوط به کلاس A ملکولی هستند. سوبسترای این آنزیم ها کرباپنم ها هستند که توسط تازوباکتام بهتر از کلاولانیک اسید مهار می شوند. سفالوسپورین های وسیع الطیف مثل سفنازیدیم توسط آنزیم های IMI-1 و SME به خوبی هیدرولیز نمی شوند. اما آزترونام توسط اغلب این آنزیم ها تخریب می شود به استثناء GES-3 و GES-4. خانواده SME و همچنین بتالاکتامازهای IMI-1 و NMC-1 آنزیم های کروموزومی زیر گروه 2f هستند. بتالاکتامازهای پلاسمیدی زیر گروه 2f شامل KPC و بعضی آنزیم های GES می باشند [۱۷۲].

جدول ۱-۵. طبقه بندی بتالاکتاماز ها [۱۷۲]

Bush-Jacoby System Group	Enzyme Type	Inhibition by Clavulanate	Ambler System	Main Attributes
1	Cephalosporinase	No	C	Chromosomal; resistant to all β -lactams except carbapenems
2a	Penicillinase	Yes	A (serine)	Staphylococcal penicillinases
2b	Broad-spectrum	Yes	A	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	Extended-spectrum	Yes	A	TEM- and SHV variants
2br	Inhibitor resistant	Diminished	A	Inhibitor resistant TEM
2c	Carbenicillinase	Yes	A	Carbenicillin hydrolyzing
2d	Cloxacillinase	Yes	D	Oxacillin hydrolyzing (OXA)
2e	Cephalosporinase	Yes	A	Cephalosporinases
2f	Carbapenemase	Yes	A	Carbapenemases inhibited by clavulanate (eg, IMP-1)
3a, 3b, 3c	Metalloenzymes	No	B	Zinc-dependent carbapenemases
4	Penicillinase	No	Not classified	Misc enzymes, not yet sequenced

IMP, imipenem; SHV, sulfhydryl variable; TEM, TEMoniera.

گروه ۳: متالوبتالاکتاماز، به کلاس مولکولی B تعلق دارند (توسط کلاولانیک اسید مهار نمی شوند). تنها آنزیم های بتالاکتاماز می باشند که برای فعالیت به فلز روی نیاز دارد. این آنزیم های قادر به هیدرولیز پنی سیلین ها، سفالوسپورین ها و کارباپنم ها هستند. برخلاف سرین بتالاکتامازها، متالوبتالاکتامازها تمایل ضعیف برای هیدرولیز منوباکتام ها دارند. این آنزیم ها به طور عمده و مکرر در باکتری های غیر تخمیری وجود دارند و همچنین در انتروباکتریاسه جداسازی می شوند [۱۷۲].

Extended Spectrum Beta-lactamase با طیف گسترش یافته ۲۰-۲۰-۱ بتالاکتامازهای (ESBLs):

این آنزیم ها قادرند بخش اعظم آنتی بیوتیک های بتالاکتام را که به طور رایج استفاده می شوند هیدرولیز نموده و به همین دلیل آنها بتالاکتامازهای طیف گسترش یافته (ESBLs) نامیده می شوند که باعث مشکلات کلینیکی جدی می شوند. با این تعاریف ESBL ها مولکولهای بتالاکتاماز کلاس A یا کلاس D می باشند که: (۱) قادر به هیدرولیز اکسی ایمینو سفالوسپورین ها در اندازه ای برابر یا ۱۰٪ بیشتر از بنزیل پنی سیلین می باشند، (۲) در جایگاه فعالشان اسید آمینه سرین وجود دارد و (۳) به طور معمول به وسیله مهارکننده های بتالاکتامازها مثل کلاولانیک اسید و سولباکتام یا تازوباکتام مهار می شوند [۱۷۹ و ۱۳۹].

ESBL ها اغلب به وسیله پلاسمیدهای با اندازه ای بالغ بر ۱۰۰ کیلو باز و حتی بیشتر کد می شوند که قابل انتقال از سویه ای به سویه دیگر و مابین گونه های باکتریایی می باشند [۱۸۱-۱۸۰]. چیزی که ما درباره تکامل ESBL ها می دانیم این است که این آنزیم ها با تغییراتی در ساختار ژن های تولید کننده OXA، SHV، TEM و پنی سیلیناز، باعث فعالیت هیدرولیتیک بیشتر می شوند که سبب تغییرات ساختمانی جدی درون ناحیه فعال پروتئین شده و این موتاسیون با تغییر فعالیت بتالاکتاماز باعث افزایش مقاومت علیه سفالوسپورین های نسل سوم می شود. در نتیجه، نه تنها سبب مقاومت به پنی سیلین ها و

سفالوسپورین های نسل اول و دوم می شود بلکه باعث مقاومت به اکسی ایمینو سفالوسپورین ها (سفتواکسیم، سفنازیدیم و سفتریاکسون) و منوباکتام ها (آزترونام) نیز می شود. این در حالی است که α -7 متوکسی سفالوسپورین ها (سفامایسین ها) و کاربانیم ها به طور معمول فعال باقی می ماند. علی رغم اینکه ESBL ها به طور تئوریک به وسیله مهارکنندگان بتالاکتاماز مثل کلاولانات، سولباکتام یا تازوباکتام مهار می شوند ولیکن این مهار کنندگان بتالاکتاماز به طور معمول بر علیه آنزیم های کلاس C غیر موثر می باشند. همچنین ESBL های تولید شده توسط انتروباکتریاسه باعث گسترش مقاومت و انتقال آن در بین سویه ها از طریق عناصر متحرک ژنتیکی و با استفاده از روش های مختلف می شوند [۱۸۲]. ارگانسیم های تولید کننده ESBL برای اولین بار در سال ۱۹۸۳ شناسایی شدند که مسئول شیوع و گسترش سریع عفونت های متعدد در سطح جهان بودند. از آن به بعد ESBL ها متناوباً "به صورت سریع گسترش یافتند و باعث بروز مشکلات عمده ای در کلینیک ها بخصوص در بخش مراقبت های ویژه گردیدند. اطلاعات منتشر شده کلینیکال نشان داده اند که ESBL ها عامل بسیاری از گرفتاریهای مهم و همیشگی کلینیکی هستند و در صورت رویارویی با پاتوژن های دارای آنزیم های ESBL ضرورت استفاده مناسب از مواد ضد باکتریایی امری بدیهی به نظر می رسد [۱۷۹-۱۷۸ و ۱۷۱].

۱-۲۰-۲-۱ انواع تیپ های ESBL:

ESBL های کلاسیک از پلاسمید های کد کننده خانواده های TEM، سولفیدریل متغیر (SHV) و اکزاسیلیناز (OXA) منشاء می گیرند. در کنار این خانواده اصلی که شامل واریانت ESBL های اولیه تعریف شده می باشند خانواده های جدیدی نیز ایجاد شده است [۱۸۰ و ۱۷۲]. در سالهای اخیر انفجاری از ESBL های غیر TEM و SHV توسعه یافته و در سطح دنیا پخش گردیده است. (برای مثال خانواده های CTX-M، BES، TLA، GES، VEB و PER). تکامل ESBL ها به قدری سریع بوده است

که یک website (www.lahey.org/studis) برپا گردیده که تمام پیشرفت های جدید در این زمینه را در آن جای می دهند. ملاک ضروری مهم برای ایجاد یک شماره (واریانت) جدید، به عنوان مثال تغییرات خاصی همانند ایجاد تغییر فقط در توالی پروموتور یا تعویض نوکلئوتیدی که به صورت جهش خاموش شود برای ایجاد یک واریانت آنزیمی جدید کافی نیست [۱۷۵].

۱-۲۰-۲ ویژگی های حساسیتی ESBL ها:

ESBL ها با آنزیم های والدی خودشان به وسیله جایگزینی در ۱ تا ۷ آمینواسید تفاوت دارند که باعث تغییر شکل فضایی و ویژگی جایگاه فعال آنها می شود. ۶ ژن bla_{TEM} آنزیم های تیپ TEM-6 توسط ژنهای (bla_{TEM-1} , bla_{TEM-2} , bla_{TEM-3} , bla_{TEM-4} , bla_{TEM-5} و bla_{TEM-6}) کد شده و هفتمین ژن توسط ۵ موتاسیون خاموش در ۱۰ جایگاه مختلف اتفاق می افتد که ۳ مورد آن در ناحیه پروموتور (نوکلئوتیدهای ۳۲، ۱۶۲ و ۱۷۵) و ۷ مورد دیگر در داخل ژن (نوکلئوتیدهای ۲۲۶، ۳۴۶، ۴۳۶، ۶۰۴، ۶۸۲، ۹۱۳ و ۹۵۲) اتفاق می افتند [۱۸۱]. مهمترین جانشینی موتاسیون های وسیع الطیف در جایگاه ۱۶۴ در TEM ها، ۱۷۹ در SHV ها و ۲۳۸ در هر دو می باشد که به وسیله بازشدن یا وسیع تر شدن در جایگاه فعال، فضای مناسب برای ورود زنجیره های جانبی اکسی ایمینو حجیم داروهای بتالاکتام را فراهم می سازد که بدین ترتیب سبب ایجاد سایر تیپ ها می شود [۱۷۹]. ESBL ها قادر به هیدرولیز آنتی بیوتیک های بتالاکتام شامل گروه اکسی ایمینو (سفتازیدیم، سفوتاکسیم، سفتریاکسون، سفوروکسیم و آزترونام) به نسبت ۱۰٪ بیش از بنزیل پنی سیلین می باشند. همچنین ESBL هایی با قدرت هیدرولیز کمتر نسبت به TEM-1، TEM-2 و SHV-1 دیده شده است که تمایل کمتری به سوبستراهایشان دارند. به هر حال جانشینی آمینواسیدها در جایگاه های اصلی به طور تقریبی به ESBL ها اجازه هیدرولیز برابر را می دهد. برای مثال برخی شامل TEM-3، TEM-4، SHV-4 و SHV-5 دارای Vmax

برابر برای هیدرولیز سفتازیدیم و سفوتاکسیم می باشند [۱۴۸] در حالی که TEM-26 دارای بیشترین مقدار Vmax برای هیدرولیز سفتازیدیم نسبت به سایر اکسی ایمینو بتالاکتام می باشد [۱۴۹]. اغلب موتاسیون های خانواده ESBL ها در مقایسه با آنزیم های والدی، فعالیت بتالاکتامازی را کاهش می دهند. سویه های حاوی آنزیم های ESBL، به طور پایداری به آمینوپنی سیلین ها (آمپی سیلین یا آموکسی سیلین) کربوکسی پنی سیلین ها (تیکارسیلین و کاربنی سیلین) و یوریدو پنی سیلین ها (پیراسیلین یا مزلوسیلین) مقاوم هستند و در مقابل، در آزمایشگاه تنها در مقابل تموسیلین^{۲۲۷} حساس می باشند. خوشبختانه ESBL ها به جز چند استثنا (برای مثال: TEM-88 و TEM-52) در مقابل سفامایسین ها (برای مثال سفوکسیتین و سفوتیتان) و کارباپنم ها (ایمپنم، دوریپنم، مروپنم و ارتاپنم)، فعال نیستند [۱۷۵ و ۱۷۸]. در حالی که گزارش های اخیر نشان می دهند که ارگانسیم های تولید کننده ESBL می توانند به سبب ظاهر شدن غشاء خارجی (برای مثال با از دست دادن پروتئین های پورین) نسبت به سفامایسین ها مقاوم گردند [۱۴۸ و ۱۳۸]. تیپ های TEM و OXA-1 که به واسطه پلاسمید تولید می شوند عامل اصلی مقاومت در برابر آموکسی سیلین / کلاولانیک اسید در *E. coli* و تیپ های TEM و SHV عامل اصلی مقاومت به سفالوسپورین های نسل سوم در انتروباکتریاسه می باشند [۱۸۲].

۱-۲۱ بتالاکتامازهای تیپ TEM:

برای اولین بار در سال ۱۹۶۵ گزارش شد. این آنزیم در یک *E. coli* ایزوله شده از کشت خون یک بیمار یونانی بنام تمونیریا^{۲۲۸} دیده شد [۱۴۹ و ۱۵۹] و در پی آن بتالاکتامازهای TEM-1 در سراسر جهان پخش شده و در حال حاضر معمول ترین مکانیسم مقاومت باسیل های گرم منفی در مقابل آنتی بیوتیک های بتالاکتام را به خود اختصاص می دهند. در *E. coli* بیش از ۶۰-۵۰٪ از مقاومت وابسته به پلاسمید در

^{۲۲۷} Temocilin
^{۲۲۸} Temoniera

مقابل آمپی سیلین در ارتباط با بتالاکتامازهای تیپ TEM-1 می باشد [۱۷۵ و ۱۸۳]. وجود ژن واقع شده در ترانسپوزان مختلط Tn₃، اجازه داده است که طی حوادث ترانسپوزیشن و بازآرایی ژن ها، ژن TEM-1 به تعداد فزاینده ای به سویه های *Haemophilus influenza* و *Neisseria gonorrhoeae* مهاجرت نماید. bla_{TEM-2} اولین مشتق از بتالاکتامازهای اصلی bla_{TEM-1} می باشد که، تفاوت آن تنها در جانشینی یک اسید آمینه می باشد [۱۸۱ و ۱۳۸]. هر دو آنزیم قادر به هیدرولیز پنی سیلین ها و سفالوسپورین های نسل اول می باشند ولی قادر به حمله به اکسی ایمینو سفالوسپورین ها نیستند. bla_{TEM-2} و bla_{TEM-1} جزء بتالاکتامازهای با طیف وسیع می باشند. اما از آنجایی که قادر به هیدرولیز اکسی ایمینو سفالوسپورین ها نمی باشند، جزء ESBLs یعنی بتالاکتامازهای با طیف گسترده نمی باشند. bla_{TEM-3} اولین واریانت TEM می باشد که در مقابل سفالوسپورین های طیف گسترده، فعالیت زیادی داشته و در سال ۱۹۸۷ گزارش شد [۱۷۵ و ۱۸۱] و تا به امروز افزایش قابل توجهی در تعداد و انواع واریانت های TEM طیف گسترده مشاهده شده است. اگرچه بتالاکتامازهای تیپ TEM اغلب در *E. coli* و *K. pneumoniae* یافت می شوند ولی این آنزیم ها در دیگر جنس های آنتروباکتریاسه نظیر *Enterobacter aerogenes*، *Morganella morganii*، *Proteus mirabilis*، *Proteus rettgeri* و *Salmonella spp* نیز یافت شده است [۱۳۷-۱۳۶ و ۱۷۲]. همچنین ESBL های تیپ TEM در باکتریهای غیر از خانواده آنتروباکتریاسه نیز یافت می شوند. به عنوان مثال، TEM-42 در یک سویه *Pseudomonas aeruginosa* و TEM-17 در کاپنو سایتوفاگا اکراسیا^{۲۲۹} ایزوله شده از کشت خون گزارش شده است [۱۸۵-۱۸۴]. همچنین در تحقیقی در چین ایزوله های *Enterobacter cloacae* دارای آنزیم های TEM-141، TEM-29، TEM-1 و TEM-157 بودند [۱۵۹ و ۱۷۵]. مقاومت های طیف گسترده تر در ناحیه ای از آنزیم که دارای چهار موقعیت مجاور بوده و محدود به جایگاه فعال آنزیم

می شوند، توسط موتاسیون های نقطه ای به وجود می آیند. در آنزیم های طبیعی، تمام این عناصر در موقعیت نزدیک یا در جایگاه فعال آنزیم قرار گرفته اند که جایگزینی اسیدهای آمینه سبب بازتر شدن جایگاه فعال آنزیم گردیده و به طور اختصاصی اجازه می دهد تا بتوانند به اکسی ایمینو سفالوسپورین های طیف گسترده متصل شده و بر هم کنش انجام دهند [۱۷۵]. در بتالاکتامازهای تیپ TEM-1، جانشینی آمینواسیدی ایجاد شده در آزمایشگاه در بسیاری از نواحی آنزیمی به کاهش فعالیت آن منجر نمی شود. باز شدن ناحیه فعال در سوبستراهای بتالاکتام نیز به طور تپیک، حساسیت آنزیم به مهارکنندگان بتالاکتام مثل کلاولانیک اسید را افزایش می دهد. هر نوع جانشینی آمینواسیدی (غیر از جانشینی منجر به فنوتیپ ESBL) مقاومت به مهارکننده را ایجاد می کند [۱۸۶ و ۱۶۰]. از اولین گزارش های منتشر شده تا کنون، با توالی یابی نوکلئوتیدی آنزیم ها، ۲۲۳ آنزیم تیپ TEM و ۱۹۱ آنزیم SHV شناسایی شده اند (27 : www.lahey.org/studis march 2015).

۱-۲۱-۱ بتالاکتامازهای TEM مقاوم به مهارکننده (IRT)^{۳۳۰}:

زمانی که مهارکنندگان بتالاکتاماز برای مصارف کلینیکی معرفی شدند به جز موارد نادری از *E. coli* که به طور فنوتیپیک مقاوم به آمپی سیلین/کلاولانات بوده و قادر به تولید آنزیم TEM-1 بودند، در واقع هیچ مقاومتی علیه آنها شناسایی نشده بود [۱۸۷]. متأسفانه از سال ۱۹۹۰ در برخی از واریانت های تیپ TEM از ESBL ها موتاسیون هایی در موقعیت های اسید آمینه ۶۹، ۱۳۰، ۲۴۴، ۲۷۵ و ۲۷۶ مشاهده گردید که سبب ایجاد مقاومت به مهارکنندگان بتالاکتاماز می شدند [۱۸۸]. اغلب این موتاسیون ها سبب فعالیت بسیار قوی ESBL ها می شوند. بنابراین همانند بتالاکتامازهای TEM، مقاوم به مهار کننده هستند و قادر به هیدرولیز سفالوسپورین های نسل سوم نمی باشند. به هر حال سویه های نادری مثل bla_{TEM-68} و

^{۳۳۰} Inhibitor Resistant TEM (IRT)

*bla*_{TEM-50} یافت می شوند که توانایی نگهداری هر دو فعالیت خود را در سطوح معین شده دارند [۱۸۷]. این بتالاکتامازهای TEM مقاوم به مهار کننده، اغلب در نمونه های بالینی *E. coli* و برخی از سویه های *Citrobacter freundii* و *K. pneumoniae*، *K. oxytoca*، *P. mirabilis* یافت شده است [۱۸۸]. واریانت های TEM مقاوم به مهار کننده، به کلاولانیک اسید و سالباکتام مقاوم هستند، لذا در نمونه های بالینی، نسبت به ترکیب بتالاکتام و کلاولانات مثل آموکسی سیلین / کلاولانات، تیکارسیلین / کلاولانات و آمپی سیلین / سالباکتام مقاومت نشان می دهند، در حالی که به تازوباکتام و نیز به ترکیب پیراسیلین و تازوباکتام حساس باقی می مانند [۱۸۸]. مهارکنندگان بتالاکتاماز، فعالیت های یوریدو پنی سیلین ها و کربوکسی پنی سیلین ها را در مقابل بتالاکتامازهای گروه 2b و Bush 2bc به آنها باز می گرداند. در مطالعات سال های اخیر نشان داده شد، تنها آنزیمی که جایگزینی اسید آمینه Asn276Asp، Met64leu، Arg164Ser در آن اتفاق افتاده باشد هر دو فنوتیپ TEM مقاوم به مهار کننده (IRT)^{۳۱} و ESBL را به باکتری القاء می کند. این ترکیب مقاومت مشخص شده ای به سفتازیدیم ایجاد نموده و در برخی به مهار با کلاولانیک اسید می انجامد، در عین حال آنزیم به مهار با تازوباکتام حساس باقی می ماند [۱۸۷ و ۱۷۹]. اگرچه ارگانسیم های دارای این آنزیم ها، نسبت به ترکیبات بتالاکتام و مهار کننده های بتالاکتاماز مقاوم هستند، ولی این ارگانسیم ها نسبت به سفالوسپورین های طیف باریک (سفالتوین) و طیف گسترده (سفتازیدیم و سفتریاکسون) و همچنین نسبت به کارباپنم ها و منوباکتام ها حساس باقی مانده و در اغلب موارد مقاومت نسبت به آموکسی سیلین / کلاولانات و آمپی سیلین / سالباکتام بیش از مقاومت نسبت به پی پراسیلین / تازوباکتام می باشد [۱۸۵-۱۸۴].

۱-۲۲ بتالاکتامازهای تیپ SHV:

به نظر می رسد بتالاکتامازهای خانواده SHV از سویه های کلبسیلا مشتق شده اند. پیش ساز آنزیمهای کلاس SHV، آنزیم SHV-1 می باشد که به طور معمول در کلبسیلا پنومونیه یافت می شود. آنزیم SHV-1 در کلاس A و گروه 2b بتالاکتامازها قرار می گیرد [۱۷۵ و ۱۳۶]. در بسیاری از سویه های کلبسیلا پنومونیه ژن کدکننده SHV-1 بر روی کروموزوم باکتری واقع شده و ممکن است که بعدها توسط ادغام با پلاسمید به سایر گونه های انتروباکتریاسه پخش شده باشد. SHV-1، مقاومت نسبت به پنی سیلین های طیف گسترده مثل آمپی سیلین و تیکارسیلین و پپراسیلین را القاء می نماید، اما نسبت به اکسی ایمینو سفالوسپورین ها مقاومتی ایجاد نمی کند و توسط مهار کنندگان بتالاکتاماز مثل تازوباکتام غیر فعال می شود. در سال ۱۹۸۳ یک سویه کلبسیلا پنومونیه و یک سویه سریشیا مارسی سنس در کشور آلمان غربی شناسایی شدند که همانند سفالوسپورینازهای جدید قابل انتقال با پلاسمید، باعث انتقال مقاومت به سفوتاکسیم می گردیدند [۱۸۹ و ۱۸۵]. این بتالاکتاماز وابسته به پلاسمید جدید که SHV-2 نامیده شد از موتاسیون در SHV-1 حاصل شده بود و موتاسیون حاصله یعنی تغییر در موقعیت آمینواسیدی ۲۳۸ از گلیسین به سرین، به افزایش گرایش بتالاکتاماز SHV-1 برای اکسی ایمینو سفالوسپورین ها با افزایش معنی دار در MIC سفوتاکسیم و افزایش محدودتر در MIC سفتازیدیم منجر شد [۱۸۷ و ۱۳۶]. تعدادی از واریانت های ESBL حاوی تغییرات اضافی در موقعیت آمینواسیدی نیز گزارش شده است. تغییرات اضافی غالباً در موقعیت ۱۷۹، ۲۰۵ و ۲۴۰ اتفاق افتاده و منجر به افزایش فنوتیپ ESBL ها شده است، به نحوی که اکنون بیش از ۱۱۷ آنزیم ESBL تیپ SHV وجود دارد [۱۹۰]. در اغلب مواقع، تغییر در آمینواسیدها هماهنگ عمل نموده و نقش تعاونی^{۲۳۲} جهت توانایی آنزیم برای هیدرولیز سفالوسپورین های جدیدتر دارند، در نتیجه افزایش بیشتری در مقاومت نسبت به سفوتاکسیم و سفتازیدیم به وجود می آید. برخلاف آنزیم های دسته TEM، تنها یک گزارش از واریانت SHV با فنوتیپ مقاوم به مهار کننده وجود

دارد. در SHV-10 جایگزینی اسید آمینه سرین در موقعیت ۱۳۰ با گلیسین سبب حفظ توانایی این آنزیم در هیدرولیز پنی سیلین ها به طور ناقص و کاهش فعالیت آن نسبت به سفالوسپورین ها به طور موثر شده است [۱۵۸ و ۱۷۲]. این تغییرات در توالی آمینواسیدی آنزیم های SHV سبب ایجاد تیپ های مختلف این آنزیم ها در بین گونه های مختلف باکتریها در نقاط مختلف جهان می شود. در تحقیقی در چین ایزوله های *Enterobacter cloacae* دارای آنزیم های SHV-12 و SHV-70 بودند [۱۸۸] و در مطالعه ای در هلند وجود تیپ جدید SHV-31 در ایزوله های *K. pneumoniae* گزارش شد [۱۵۸].

۱-۲۳ بتالاکتامازهای تیپ CTX-M :

مابین خانواده های جدید ESBL ها تیپ CTX-M به طور اختصاصی سبب هیدرولیز سفوتاکسیم می شود و در سالهای اخیر گسترش یافته است [۱۸۷]. آنزیم های CTX-M احتمالاً با انتقال عمودی ژن و موتاسیون از بتالاکتامازهای *AmpC* کروموزومی از کلثوراسکوبراتا^{۲۳۳} (۹۹٪ همولوژی با CTX-M-2) حاصل شده اند [۱۴۸]. آنها توانایی هیدرولیز سفالوسپورین های طیف گسترده را بدون جانشینی چند اسید آمینه دارند و امکان گسترش و تنوع سوبسترا برای اکسی ایمینو بتالاکتام ها را برای آنزیم اجدادی فراهم می سازند. مشخصه غیر معمول دیگر این آنزیم ها این است که ۱۰ برابر، فعالیت مهارتی قوی تری را نسبت به کلاولانیک اسید نشان می دهند [۱۷۵]. آنزیم های CTX-M با شباهت های توالی آمینواسیدی می توانند به زیرگروه های متعددی تقسیم شوند. مطالعات فیلوژنتیک پنج گروه عمده از آنزیم های CTX-M نشان دهنده این است که اعضاء هر گروه بیش از ۹۴٪ همولوژی در بین اعضا همان گروه و کمتر و یا برابر با ۹۰٪ شباهت با اعضاء گروه های بعدی دارند. ۱- گروه ۱ و ۳ شامل (CTX-M 1, 3, 10, 12, 15) با ۲۲, 23, 28- گروه ۲ شامل (CTX-M 2, 4, 5, 6, 7, 20) و ۳- گروه ۸ شامل (CTX-M 8)-

^{۲۳۳} *Klyuvera ascorbata*

CTX-M)، گروه ۹ شامل (CTX-M 9, 13, 14, 16, 17, 19, 21, 24, 27) - گروه CTX-M 25 شامل (CTX-M 25). اولین بتالاکتاماز CTX-M (CTX-M-1) در سال ۱۹۸۹ در کشور آلمان جدا گردید [۱۷۵]. از آن به بعد آنزیم های CTX-M به سرعت در ۲ گونه کلینیکی انتروباکتریاسه بخصوص در آمریکای جنوبی (در آرژانتین و سایر کشورهای همسایه) و سایر نقاط جهان افزایش پیدا کرد [۱۴۸ و ۱۷۵]. اخیراً، آنزیم های CTX-M شناسایی شده از تعدادی نمونه های مدفوعی در بسیاری از بخش های جهان، گسترش و شیوع واریانت های این آنزیم را آشکار می سازند. به عنوان مثال در ژاپن (CTX-M-3، CTX-M-9)، چین (CTX-M-14، CTX-M-13)، ویتنام (CTX-M-17)، تایوان (CTX-M-5، CTX-M-14)، کره (CTX-M-14)، کنیا (CTX-M-17)، هندوستان (CTX-M-15)، روسیه (CTX-M-14)، یونان (CTX-M-12)، لهستان (CTX-M-3)، اسپانیا (CTX-M-9، CTX-M-5 و CTX-M-10) و در فرانسه CTX-M-2، CTX-M-1 (CTX-M-3) نشان از پراکندگی و گسترش بتالاکتامازهای تیپ CTX-M در سال های اخیر می دهد که علاوه بر نگرانی در این مورد سبب ایجاد مقاومت به همه سفالوسپورین ها می شود. در سویه های بالینی، ژن های کد کننده CTX-M غالباً، روی پلاسمید واقع شده اند که اندازه پلاسمید ها از ۷ تا ۱۶۰ کیلو باز تفاوت می کند. اغلب ژن bla_{TEM-1} در همان پلاسمید به طور همزمان وجود دارد و ارتباط آن با ژن های تیپ bla_{TEM-2} ، bla_{OXA-1} و bla_{SHV} محتمل است. این پلاسمید ها نیز می توانند ژن های مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های دیگر از جمله آمینوگلیکوزیدها، کلرامفنیکل، سولفانامیدها، تری متوپریم و تتراسایکلین را با خود حمل کنند [۱۷۵]. پلاسمیدهای کدکننده CTX-M غالباً به روش کانجوگاسیون در آزمایشگاه قابل انتقال هستند و فرکانس انتقال از 10^2 تا 10^7 در هر سلول دهنده تغییر می کند. به طور مثال همان تیپ و برش آنزیمی با PstI در پلاسمید حمل کننده CTX-M-3 bla در هفت گونه مختلف خانواده انتروباکتریاسه در هلند مشاهده شده است. آخرین ژن روی قطعات برش داده شده با آنزیم

محدودالثر *BamHI* و *EcoRI* در چین مشاهده شده که ژن ها روی پلاسمیدهایی با اندازه ۶۰ تا ۱۵۰ کیلو باز واقع شده اند و همان ژن ها روی کروموزوم *Enterobacter cloacae* واقع شده اند. همچنین در دو تحقیق در سالهای ۲۰۰۷ و ۲۰۰۸ در چین که بر روی ایزوله های *Enterobacter cloacae* انجام شد آنزیم CTX-M-22 مشاهده شد [۱۸۸-۱۸۱ و ۱۷۵]. اطلاعات فوق نشان می دهند که ژن های *bla* CTX-M متحرک هستند و می توانند از پلاسمیدی به پلاسمید دیگر و یا از پلاسمید به کروموزوم انتقال یابند [۱۷۵].

۱-۲۴ بتالاکتامازهای تیپ OXA:

آنزیم های تیپ OXA یک خانواده در حال گسترش از ESBL ها می باشند. این آنزیم ها به دسته مولکولی d و گروه ۲d تعلق دارند که از این جهت با آنزیم های تیپ TEM و تیپ SHV تفاوت دارند. بتالاکتامازهای تیپ OXA باکتری را به آمپی سیلین و سفالوتین مقاوم می کنند ، با فعالیت هیدرولتیکی بالا در مقابل اکساسیلین و کلوکساسیلین تمایز می یابند و به طور ضعیف توسط کلاولانیک اسید مهار می شوند. این آنزیم ها عمدتاً در *Pseudomonas aeruginosa* یافت می شوند، در حالی که اغلب ESBL ها در *E.coli*، *K.pneumoniae* و سایر آنتروباکتریاسه ها وجود دارند [۱۹۲]. برخی اکساسیلینازها، در حد معنی داری مترادف آمینواسیدی یکسان دارند ولی با کلاس D ۲۰ تا ۳۰٪ شباهت آمینواسیدی دارند. بدین ترتیب خانواده OXA بیش از آنکه یک گروه ژنوتیپیک باشند، یک گروه فوتیپیک در نظر گرفته شده است. بتالاکتامازهای OXA دارای گروه سرینی در ناحیه فعال می باشند و همانند بتالاکتامازهای دسته A و C معمولاً مقاومت به پنی سیلین های آمینی و یوریدی را به باکتری القاء می کنند و نیز فعالیت هیدرولتیکی بالایی در مقابل کلوکساسیلین، اکساسیلین و متی سیلین دارند و به جز OXA-18 فعالیت آنها به طور ضعیفی به وسیله کلاولانات مهار می شود [۱۸۶ و ۱۸۴ و ۱۶۰]. گزارش هایی از

خانواده ESBL ها ی حامل تیپ OXA در منطقه ای از ترکیه از ایزوله های *P. aeruginosa* رسیده است. چندین ESBL تیپ OXA (OXA-14, OXA-16, OXA-17, OXA-11)، (OXA-10 مشتق شده اند و OXA-15 مشتقی از OXA-2 می باشد. OXA-1 از دیگر آنزیم های تیپ OXA به طور مستقیم مشتق نشده است و با ۴۲٪ همولوژی قرابت بیشتری به OXA-9 دارد [۱۷۸]. اغلب ژن های اکسازیلیناز روی ترانسپوزان، پلاسمید و یا روی انتگرون واقع شده اند که وسیله انتشار جهانی آنها را فراهم می سازد [۱۸۷].

۱-۲۵ بتالاکتامازهای تیپ AmpC:

بتالاکتامازهای AmpC معمولاً به وسیله بتالاکتام ها القا می گردند و با ژن های کروموزومی در بسیاری از باسیل های گرم منفی کد می شوند. بتالاکتامازهای وابسته به پلاسمید AmpC در سال ۱۹۸۸ گزارش شده است [۱۷۹]. بتالاکتامازهای وابسته به پلاسمید AmpC توسط انتقال ژن های کروموزومی، بتالاکتامازهای AmpC قابل القاء بر روی پلاسمید بوجود آمده اند. این نوع انتقال ژن، سبب پخش بتالاکتامازهای وابسته به پلاسمید AmpC به نمونه های بالینی *E. coli*، *Enterobacter aerogenes*، *Klebsiella pneumoniae*، *Citrobacter freundii*، *Salmonella spp.* و *Proteus mirabilis* شده است. تفاوت AmpC های کروموزومی نسبت به AmpC های وابسته به پلاسمید در غیر قابل القاء بودن آنها می باشد. هم ESBL ها و هم بتالاکتامازهای وابسته به پلاسمید AmpC به طور تئوریک به مقاومت وسیع چند دارویی وابسته هستند (معمولاً ژن های سایر مکانیسم های مقاومت آنتی بیوتیکی روی همان پلاسمید هایی که ژن ESBL و ژن های AmpC واقع می باشند قرار دارند) [۱۹۳]. بتالاکتامازهای وابسته به پلاسمید یک مشکل عمده کلینیکی می باشند که مقاومت به همه آنتی بیوتیک های بتالاکتام به جزء سفپیم، سفپروم و کارباپنم ها را فراهم می سازند و این مقاومت از طریق کانجوگاسیون نیز قابل انتقال می

باشد. بتالاکتامازهای AmpC به طور مشخص مقاومت یکسان نسبت به سفاماسین ها و اکسی ایمینو بتالاکتام ها را نشان می دهند و به مهار توسط کلاولانیک اسید مقاوم هستند. شایعترین AmpC های بتالاکتاماز ACT-1, DHA-1, FOX-1, LAT-1, MOX-1, MIR-1, CMY-2, CMY-1, ACC-1, CFE-1 [۱۷۵].

۲۶-۱ بتالاکتامازها و سایر گروه های ESBL :

علاوه بر آنزیم های خانواده های اصلی، آنزیم های غیر معمولی که دارای فعالیت های با طیف گسترده بودند نیز وجود دارند که از آن جمله می توان به (BES-1, CME-1, VEB-1, PER, SFO-1) اشاره نمود. ظهور این آنزیم های بتالاکتاماز جدید نشان دهنده افزایش ژن های بتالاکتاماز در بین ژن های باکتریایی است، اما این آنزیم های غیر معمول به ندرت دیده می شوند. بتالاکتامازهای تیپ PER-1 اولین بار در سویه های سودوموناس آئروجینوزا در بیماران ترکیه گزارش شده بود و در سراسر ترکیه یافت شده و همچنین در ۶۰٪ از سویه های مقاوم به سفتازیدیم آسیتوباکتر بومانی نیز دیده شده است [۱۹۰]. یک آنزیم وابسته به آن یعنی PER-2 که ۸۶٪ همولوژی با PER-1 دارد نیز در میان ایزوله های سالمونلا انتریکا سروار تیفی موریوم^{۲۳۴} در آرژانتین یافت شده است [۱۹۴]. همچنین برای اولین بار در *E. coli* یک آنزیم دیگر تحت عنوان VEB-1 در بیماری از ویتنام گزارش شد که پس از آن در تایلند در سویه های سودوموناس نیز مشاهده گردید. GES-1 یک آنزیم ESBL غیر معمول دیگر است که به سایر آنزیم های بتالاکتاماز وابسته به پلاسמיד وابستگی زیادی ندارد و ۳۶٪ همولوژی با یک کاربنی سیلیناز جدا شده از *Proteus mirabilis* نشان می دهد [۱۶۰].

۲۷-۱ شیوع ESBL ها و ریسک فاکتورها

^{۲۳۴} *Salmonella enterica serovar typhimurium*

شیوع ارگانسیم های تولید کننده ESBL در مناطق جغرافیایی به دلایل مختلف تعیین می شود. البته باید در نظر داشت که یافته ها در مورد ESBL ها، گزارشهای متناقض و ناهماهنگ گسترش ESBL ها به دلیل بی توجهی و دست کم گرفته شدن آنها اتفاق افتاده است. دلیل دیگر گسترش وتنوع بالای ESBL ها تعدد مراکزی است که تحقیق در آنها انجام شده و تاثیر به سزایی در به دست آمدن اطلاعات از نظر کیفی و کمی در یافته های تجربی داشته است [۱۷۵]. مصرف بی رویه آنتی بیوتیک ها بخصوص سفتازیدیم، بستری شدن در بخش ICU و استفاده از سوندهای ادراری و کاتترها جزء عوامل شیوع ESBL ها بودند. نتایج انتشار یافته در تحقیقات علمی گوناگون در سال های گذشته در مورد سویه های *E. coli* تولید کننده ESBL در کشورهای مختلف به شرح ذیل بوده است: سال ۲۰۰۶ در پاکستان ۵۳/۳٪ [۱۹۵]، سال ۲۰۰۲ در هندوستان ۶۸٪ [۱۹۶]، سال ۲۰۰۵ در اسپانیا ۵۱/۸٪ [۱۹۴]، سال ۲۰۰۴ در کره ۹/۲٪ [۱۹۷]، سال ۲۰۰۵ در لبنان ۱۳/۳٪ [۱۹۸]، سال ۲۰۰۵ در اسرائیل ۲۲٪ [۱۶۱]، سال ۲۰۰۵ در آلمان ۱۰/۳٪ [۱۹۹]، سال ۲۰۰۶ در فرانسه ۴٪ [۲۰۰]، سال ۲۰۰۴ در ترکیه ۱۷٪، سال ۲۰۰۴ در بنگلادش ۴۳/۲٪ و همچنین در سال ۲۰۰۳ در ایالات متحده ۱۰-۲٪ [۲۰۱] و سال ۲۰۰۲ در چین ۱۳-۳۵٪ [۲۰۰] سال ۲۰۱۰ در نیجریه ۳۶/۸٪ [۱۷۱] و همینطور در مطالعه ای در ترکیه در سال ۲۰۱۱، ۸۷٪ [۱۵۴] از ایزوله های اشرشیا کلی، جدا شده از عفونتهای پای افراد دیابتی ESBL مثبت گزارش شد [۱۵۱]. در تحقیق مشترکی که در کشورهای آسیای حوزة اقیانوس آرام و استرالیا انجام شد ۸/۹٪ از ایزوله های اشرشیا کلی، ESBL مثبت گزارش شدند [۱۹۷]. همچنین در مطالعه دیگری در سال ۲۰۰۸ در هندوستان ۴۶/۵۱٪ از ایزوله های *E. coli* و ۴۴/۴٪ از ایزوله های *K. pneumoniae* از نمونه های جداسازی شده از عفونتهای پای افراد دیابتی ESBL مثبت گزارش شدند [۲۰۲]. در مطالعه ای دیگر در سوئد در سالهای ۲۰۰۲-۲۰۰۶ بر روی ایزوله های *E. coli* انجام شد، ۷۵/۲٪ دارای ژن *bla*_{TEM} بودند [۱۵۱]. همچنین در مطالعه ای در سال ۲۰۰۵ در کره، ۷۸/۳٪ از کل ایزوله های *E. coli*، ESBL مثبت (۷/۳۲٪ کل نمونه ها) دارای ژن

*bla*_{TEM} بودند [۲۰۳]. ریسک فاکتورهای آنزیم های بتالاکتاماز طیف گسترده طی چندین مطالعه case-control در مورد فاکتورهای خطر کلونیزه شدن ارگانیسم های تولید کننده ESBL دخیل در عفونت در بیماران بستری در بیمارستان انجام شده و دخالت چندین فاکتور مختلف در انتخاب و پخش سویه های مولد ESBL روشن شده است. ریسک فاکتورهای گزارش شده شامل استفاده از کاتترهای داخل عروقی، جراحی، داخل شکمی، اورژانس، گاستروکتومی و یا ژژونوستومی، کلونیزه شدن در دستگاه معدی - روده ای، همودیالیز، طول دوره اقامت در بیمارستان و یا در بخش مراقبت های ویژه، سابقه مصرف آنتی بیوتیک (از جمله سفالوسپورین های نسل سوم)، سابقه اقامت در مراکز نگهداری افراد، وخامت بیماری، وجود کاتترهای ادراری و استفاده از ونتیلاتور می باشد [۲۰۲]. در کل، این مساله مورد توافق همه واقع شده است که برخی از سفالوسپورین ها القاءکنندگان قوی برای شیوع ESBL در بیمارستان و مراکز درمانی خاص مراقبت های طولانی مدت می باشند. از میان این آنتی بیوتیک ها، سفتازیدیم جزء قوی ترین القاء کننده گزارش شده است و لذا برای محدود کردن توسعه سویه های بیمارستانی تولید کننده ESBL مصرف این آنتی بیوتیک باید محدود گردد [۲۰۲ و ۱۵۹].

فاکتورهای دیگری نیز در گسترش مقاومت شرکت دارند این فاکتورها شامل [۱] انتقال ژن های مقاومت در میان باکتریها، که سویه های حساس را به شکل مقاوم تبدیل می کند [۲] دوز و نوع آنتی بیوتیک که سبب گزینش انتخابی در سویه های خاصی از باکتری می گردد [۳] میزان مدیریت و آغاز به کار گرفتن روش اجباری بهداشت و دستورات ضد اپیدمی در بدو ورود بیمار به بیمارستان جهت کنترل و آنالیز بیمار حامل باکتری های مقاوم (ارگانیسم های مولد ESBL) ضروری می باشد. همچنین به دلیل این که پاتوژن های طبیعی مقاومت همزمان به چند دارو دارند لذا پیشگیری و مراقبت از اهمیت خاصی برخوردار است [۱۷۵ و ۱۷۲]. سایر ریسک فاکتورهای کسب عفونت با ارگانیسم های مولد ESBL در بیماران غیر بستری

شامل ابتلا به دیابت ملتیوس، سابقه بستری در بیمارستان، سابقه استفاده از سفالوسپورینها، پنی سیلین ها، فلوئوروکینولون ها، عفونت عود کننده دستگاه ادراری، سن بالای ۶۰ سال و جنسیت مذکر می باشند [۱۷۵]

۱-۲۸ روش های شناسایی آنزیم های بتالاکتاماز طیف گسترش یافته (ESBLs) :

۱-۲۸-۱ غربالگری و جداسازی اولیه ESBL ها :

بهترین نوع آزمایش، جداسازی اولیه ایزوله های تولید کننده ESBL ها، شناسایی نمونه های حساس به سفپودوکسیم، سفوتاکسیم، سفتریاکسیون، سفنازیدیم یا آزترونام می باشد و بعد از آن انجام آزمایش تاییدی با آشکار شدن یک تاثیر سینرژیک مابین یک سفالوسپورین شاخص و یک مهارکننده بتالاکتاماز (معمولا کلاولانیک اسید) می باشد. جهت انجام جداسازی، روش دیسک دیفیوژن استاندارد^{۲۳۵} یا یک روش تعیین MIC^{۲۳۶} زمانی که حداقل میزان رشد در غلظت کمتر است، استفاده می شود، می باشد. اگرچه تولید کننده های ESBL با میزان تولید بالا با استفاده از روش استاندارد دیسک دیفیوژن و مقیاس تفسیری MIC قابل تشخیص می باشند اما معمولا بسیاری از آنزیم ها سطح MIC شان به اندازه ای افزایش پیدا نمی کنند که به طور واضح هنگام استفاده از این روش افزایش میزان MIC در یک تلقیح استاندارد، مقاومت خوانده شود. بنابراین، کمیته CLSI استفاده از روش های دیسک آگار دیفیوژن استاندارد و مقیاس تفسیری MIC را برای غربالگری و جداسازی اولیه ایزوله های تولید کننده ESBL، پیشنهاد نموده است [۱۷۵].

حساسیت جداسازی برای ESBL می تواند به نوع آزمایش ضد میکروبی وابستگی زیادی داشته باشد. براساس پیشنهاد CLSI یک تا پنج نوع سفالوسپورین در غربالگری و جداسازی اولیه، باعث افزایش حساسیت تست خواهد شد. ضمن اینکه، این عمل ممکن است برای یافتن سایر انواع ESBL ها که به طور معمول موتانت های آنزیم های TEM و SHV نیستند (برای مثال آنزیم های تیپ های CTX-M)

^{۲۳۵} standard disk diffusion
^{۲۳۶} Minimum Inhibitory Concentration

و به تازگی شیوع پیدا کرده اند مفید باشد. به هر حال سفتازیدیم، سفپودوکسیم و سفوتاکسیم بهترین گزینه جهت غربالگری و جداسازی اولیه هستند. چون این ترکیبات در ارزیابی ها بالاترین میزان حساسیت را در مطالعات یافتن ESBL ها نشان داده اند. تعیین کاهش حساسیت این آنتی بیوتیک ها به میزان مقادیر اعلام شده در CLSI در باکتری های مورد آزمایش می تواند به دلیل وجود ESBLs ها و سایر مکانیزم های مقاومت باشد، که با انجام تست های تاییدی فنوتیپی حضور ESBLs ها مورد بررسی و تایید قرار می گیرد. سویه های کنترل پیشنهادی برای آزمایش MIC و دیسک دیفیوژن *E. coli* ATCC 25922 و *K. pneumonia* ATCC 700603 به ترتیب به عنوان کنترل منفی و مثبت می باشند. سویه کنترل *E. coli* ATCC 25922 در آزمایش MIC به روش رقت های بالا رونده آنتی بیوتیک در محیط کشت آبگوشتی فاقد رشد بوده ولی *K. pneumoniae* ATCC 700603 رشد می کند. در آزمایش دیسک آگار دیفیوژن قطر هاله عدم رشد برای سویه کنترل کلبسیلا عبارت است از سفپودوکسیم ۱۸-۱۰ میلی متر، آزترونام ۱۶-۹ میلی متر، سفوتاکسیم ۲۵-۱۷ میلی متر و سفتریاکسون ۲۴-۱۶ میلی متر [۱۷۵ و ۱۴۷].

۱-۲۸-۲ آزمایش های تاییدی^{۲۳۷}:

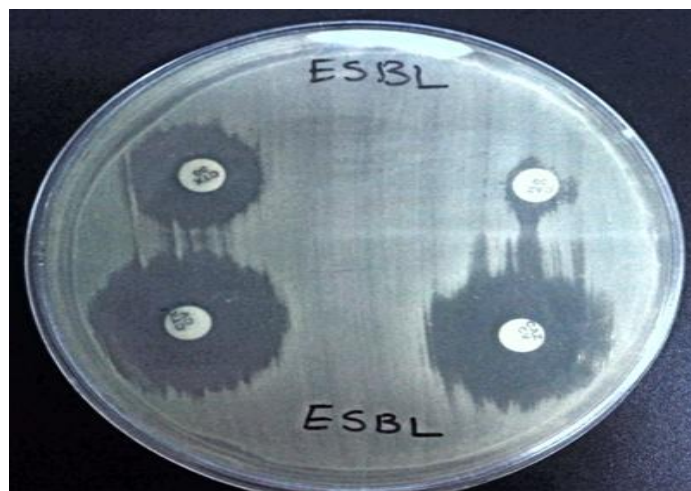
تست های فتوتیپیک تاییدی به طور معمول بر پایه تظاهرات سینرژیک مابین کلاولانیک اسید و یک سفالوسپورین شاخص انجام می شود. توسط این آزمایش ها، آنزیم های AmpC (آنزیم هایی که توسط مهار کنندگان بتالاکتاماز مهار نمی شوند) از آنزیم های ESBL تشخیص داده می شود. چندین نوع مختلف از تست های تاییدی شرح داده شده است اما تعداد کمی از آن ها برای استفاده روتین می باشد: برای مثال روش ترکیب دو دیسک^{۲۳۸}، استفاده از دیسک های ترکیبی^{۲۳۹} (DD)، حداقل غلظت مهاری (MIC) و

^{۲۳۷} Confirmatory Tests
^{۲۳۸} Combined disk

E-test. سازمان CLSI روش های MIC و دیسک های ترکیبی را به عنوان تست تاییدی پیشنهاد می کند [۱۴۷ و ۱۷۵].

۱-۲۸-۳ روش دیسک ترکیبی:

روش دیسک های ترکیبی براساس مقایسه بین هاله عدم رشد یک سفالوسپورین نسبت به همان سفالوسپورین در کنار کلاولانیک اسید می باشد. همچنان که در دستورالعمل CLSI شرح داده شده است دیسک های ترکیبی با افزودن ۱۰ میکروگرم کلاولانیک اسید به دیسک ۳۰ میکروگرمی سفوتاکسیم یا ۳۰ میکروگرمی سفنازیدیم ساخته می شود [۱۴۷ و ۱۷۵]. اگر ESBL توسط نمونه مورد نظر تولید شود قطر هاله عدم رشد توسط دیسک های دارای کلاولانیک اسید ۵ میلی متر بیشتر از دیسک های فاقد کلاولانیک اسید خواهد بود. یک اختلاف یا یک استثناء در روش ترکیب دو دیسک براساس مقایسه هاله عدم رشد وجود دارد که دیسک سفپودوکسیم ۱۰ میکروگرمی را با ترکیب سفپودوکسیم / کلاولانات با نسبت μg ۱۰+۱ مقایسه می کنند. به طور مشابه اگر از دیسک حاوی کلاولانات (سفپودوکسیم / کلاولانات) استفاده شود هاله عدم رشد در این حالت نیز ۵ میلی متر از حالتی که مهار کننده به کار نرفته بیشتر خواهد بود و نشان از تولید ESBL می باشد و همچنین نسبت قطر هاله عدم رشد با مهار کننده و یا بدون آن می تواند محاسبه گردد و نسبت ۱/۵ و یا بیشتر نشان دهنده وجود فعالیت ESBL می باشد [۱۴۷ و ۱۷۵].



شکل ۱-۱۷ روش دیسک های ترکیبی

۱-۲۸-۴ آزمایش مجاورت دو دیسک

یک روش دیگر در تایید تولید ESBL روش مجاورت دو دیسک (DDT) می باشد. برای انجام این تست ارگانیزم همانند تست حساسیت ضد میکروبی ترکیب دو دیسک بر روی محیط کشت مولر هیتون آگار با سواب پخش می شود. یک دیسک محتوی آموکسی سیلین/کلاولانات $10 \mu\text{g}$ / $20 \mu\text{g}$ در وسط پلیت قرار داده می شود و دیسک هایی شامل سفنازیدم 30 میکروگرمی استاندارد یا سفتریاکسون یا سفوتاکسیم یا آزترونام یا سفپودوکسیم $10 \mu\text{g}$ با فاصله $25-30$ میلی متر از آن قرار می گیرند. افزایش و یا نامنظمی هاله عدم رشد مابین دیسک سفالوسپورین ها به سمت دیسک حاوی کلاولانات نشان دهنده وجود ESBL می باشد [۱۹۴]. این روش معمول بوده و اجرای آن آسان و مقرون به صرفه می باشد. دیسک های به کار گرفته شده برای این آزمایش مناسب بوده و باید برای انجام آزمایشها در آزمایشگاه های روتین میکروبیولوژی نیز فراهم گردند. اشکال این روش آنست که اگر تلقیح باکتری خیلی زیاد باشد یا اگر دیسک ها خیلی از هم دور قرار داده شوند سینرژی مابین دیسک آموکسی سیلین/کلاولانات و سفالوسپورین شاخص، به طور عمده نادیده گرفته می شود. لذا برخی از محققین فاصله لبه به لبه 15 میلی

متر بین دیسک ها را مطرح کرده اند که در این صورت حساسیت آزمایش خیلی بیش از زمانی است که فاصله بین دیسک ها ۲۵-۳۰ میلی متر در نظر گرفته می شود [۱۷۵ و ۱۴۷].

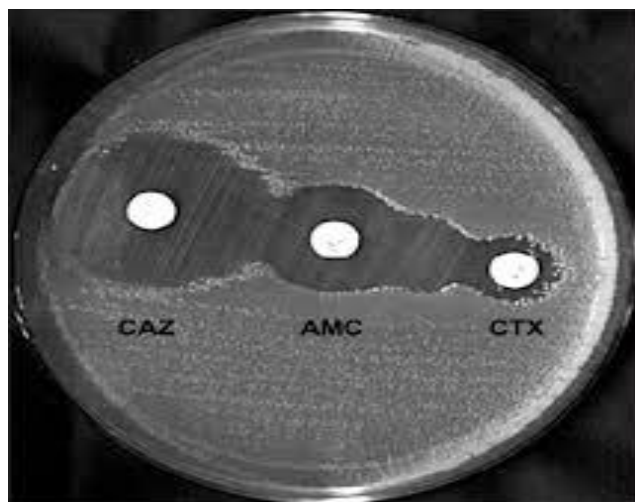


FIGURE 1- Double-disk synergy test for ESHL detection.

شکل ۱-۱۸ آزمایش مجاورت دو دیسک (DDT)

۱-۲۸-۵ روش تعیین حداقل غلظت مهار کننده (MIC):

کاهش (میزان) سطح مقاومت به یک سفالوسپورین در حضور یک مهارکننده بتالاکتاماز را نمی توان با تکنیک disk diffusion مشاهده کرد اما یک روش معادل کاربردی برای این کار روش استاندارد microdilution broth می باشد. جهت استفاده از این روش استفاده از هر دو آنتی بیوتیک سفوتاکسیم و سفتازیدیم با ۴ میکرو گرم بر میلی لیتر کلاولانیک اسید و بدون آن را توصیه می کند. میزان MIC کاهش یافته مورد انتظار در حضور مهارکننده بتالاکتاماز کاهش به میزان سه در رقت آنتی بیوتیک در آزمایش MIC است (برای مثال کاهش سه رقت برای MIC سفتازیدیم از ۸ $\mu\text{g/ml}$ به ۱ $\mu\text{g/ml}$ و برای MIC سفتازیدیم-کلاولانیک اسید است) [۱۷۵ و ۱۴۷]. این آزمایش را با استفاده از نوارهای E-test نیز می توان انجام داد که نوارهای دوطرفه هستند. در یک طرف گرادیانی از سفتازیدیم (TZ) و در طرف دیگر گرادیانی از سفتازیدیم+کلاولانات (TZL) را قرار می دهیم. پس از تلقیح باکتری مورد آزمایش طبق

دستور العمل شرکت سازنده روی محیط کشت مولر هیتون آگار نوارهای فوق روی پلیت قرار داده می شود و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون نتایج مورد بررسی قرار می گیرد. کاهش برابر و یا بیش از سه رقت در MIC سفتازیدیم در مقایسه با سفتازیدیم + کلاولانیک اسید (ظهورهاله عدم رشد و یا تغییر شکل هاله TZ) به عنوان تست مثبت برای ESBL ها در نظر گرفته می شود. نشان داده شده است که این تست حساس تر از روش مجاورت دو دیسک، در تعیین هویت ESBL ها در نمونه های بالینی می باشد. روش E-test مناسب می باشد و استفاده از آن راحت تر است ولی گاهی "به دلیل پایین بودن مقدار MIC سفتازیدیم خواندن نتایج آزمایش می تواند با مشکل همراه باشد زیرا کلاولانات به طرفی که فقط دارای سفتازیدیم است می تواند نفوذ کند [۲۰۵-۲۰۴ و ۱۹۴]. نوارهای مشابه حاوی گرادیان غلظت سفوتاکسیم و سفوتاکسیم + کلاولانات نیز در دسترس می باشد به منظور تعیین گرایش سوبستراهای مختلف، آزمایش با نوارهای TZ/TZL و CT/CTL بهتر است به طور هم زمان انجام شود. روش E-test ESBL در مطالعات مقایسه ای با نمونه های بالینی حساس تر یا حساسیت یکسان با روش مجاورت دو دیسک نشان داده است و برای استفاده مناسب ترمی باشد [۱۷۵ و ۱۴۷].

۱-۲۸-۶ ایزوالکتروفوکوسینگ :

در این روش، پس از کشت باکتری در محیط کشت Tryptcase soy broth با ۵ گرم در لیتر از عصاره مخمر و ۱۰ گرم در لیتر از گلوکز با روش سونیکاسیون بتالاکتامازهای مترشحه از آن باکتری را استخراج می نمایند. با سانتریفیوژ نمودن، سلولهای شکسته نشده و غشاء سلول های باکتریایی را حذف می نمایند. ایزوالکتروفوکوسینگ^{۲۴۰} (IEF) روی ژل پلی آکریل آمید (۷٪ آکریل آمید و ۲٪ بیش آکریل آمید) حاوی آمفولین های بادامنه pH بین ۳/۵ تا ۱۰ انجام می شود. بتالاکتامازها در ۵۰۰ ولت در مدت یک شبانه روز از همدیگر جدا می شوند. فعالیت بتالاکتامازها با روش نشاسته و ید در روی ژل ارزیابی می گردد.

^{۲۴۰} Isoelectric focusing

بتالاکتامازهایی با نقطه ایزوالکتریک (IP)^{۲۴۱} مشخص به طور مثال (TEM-1, IP 5/4; TEM-2, IP 5/6; TEM-3, IP 6/3; SHV-1, IP 7/7; SHV-4, IP 7/8) به موازات نمونه های بتالاکتاماز استخراج شده به عنوان کنترل مورد مطالعه فوکوسینگ قرار می گیرند [۱۷۵-۲۰۵-۲۰۶]. با وجود این روش های توضیح داده شده فوق فقط جهت تایید وجود ESBL ها به کار می رود و قادر به شناسایی ساب تایپ های ESBL نمی باشند در حالی که تعیین دقیق آنها با ارزش می باشد و این امر مهم فقط با روش های مولکولی امکان پذیر و قابل تعیین می باشد. از جمله تکنیک های با ارزش جهت تعیین واقعی ساب تایپ های ESBL که کاربرد دارند عبارتند از: IEF، RFLP،^{۲۴۲} DNA-Probing و PCR^{۲۴۳} می باشد [۱۷۵ و ۱۴۷].

۱-۲۹ روشهای مولکولی برای مطالعه ESBLها:

۱-۲۹-۱ اولیگوتایپینگ^{۲۴۴}:

اولین روش مولکولی مورد استفاده برای تعیین هویت بتالاکتاماز، روش اولیگوتایپینگ ارایه شده توسط Ouellette و همکاران او بود که تمایز بین TEM-1، TEM-2 را امکان پذیر می کرد [۲۰۶]. در این روش پروب های الیگونوکلوئوتید استفاده می شود که جهت تعیین موتاسیون های نقطه ای در شرایط هیبریداسیون دقیق به کار گرفته می شد سپس Mabilat و Courvalin پروب های الیگونوکلوئوتیدی را معرفی کردند که موتاسیون در شش نقطه از ژن *bla*_{TEM} را شناسایی می کند [۲۰۶]. با استفاده از این روش چندین واریانت جدید TEM در یک سری از نمونه های بالینی قابل شناسایی هستند. پروب های مورد استفاده در آزمایش های الیگوتایپینگ هم با رادیوایزوتوپ ها و هم با بیوتین نشاندار می شوند [۲۰۸-۲۰۷].

^{۲۴۱} Isoelectric Point
^{۲۴۲} Restriction Fragment Length Polymorphism
^{۲۴۳} Polymrase Chain Reaction
^{۲۴۴} Olygotyping

۱-۲۹-۲ واکنش زنجیره پلی مرز (PCR):

آسانترین و رایج ترین روش مولکولی مورد استفاده برای تعیین وجود آنزیم بتالاکتاماز متعلق به یک خانواده، روش PCR با استفاده از پرایمرهای اولیگونوکلوئوتیدی اختصاصی برای یک ژن بتالاکتاماز می باشد. پرایمرهای اولیگونوکلوئوتیدی را می توان از توالی موجود و در دسترس عموم مثل بانک ژن^{۲۴۵} و (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) انتخاب نمود. این پرایمرها را معمولاً از آن نواحی از ژن انتخاب می نمایند که بروز موتاسیون نقطه ای مختلف در آن ناحیه از ژن گزارش نشده است [۲۰۴].

۱-۲۹-۳ Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP):

طرح دیگر از خصوصیات مولکولی ژن بتالاکتاماز TEM استفاده از آنزیم های برش دهنده RFLP می باشد. در این آزمایش محصولات به دست آمده از PCR تحت تاثیر هضم چندین آنزیم آندونوکلاز واقع می شوند و اجزاء حاصله توسط الکتروفورز از همدیگر تفکیک می شوند. اندازه اجزاء حاصل شده توسط یک آنزیم برش دهنده نمایان گر موتاسیون نقطه ای در ساختمان ژن *bla*_{TEM} می باشد [۲۰۴].

۱-۲۹-۴ REP-PCR genomic fingerprinting:

روش انگشت نگاری ژنومی REP-PCR امکان تمایز بین باکتریها در سطح گونه، زیرگونه و سویه ای را فراهم می نماید. و جهت تعیین هویت و طبقه بندی باکتریها در بررسی ها و مطالعات اپیدمیولوژیک، کشاورزی، پزشکی و میکروبیهای خاک به کار می رود. در روش REP-PCR به طور طبیعی پرایمرهای مکمل برای بخش های توالی های تکراری بسیار محافظت شده که در کپی ها و تعداد زیاد در ژنوم

باکتریهای گرم منفی و چندین نوع باکتری گرم مثبت طراحی می شود. دو خانواده از این توالی های تکراری تاکنون تعیین هویت شده اند که به ترتیب شامل [۱] توالی هایی با ۳۵-۴۰ جفت باز به نام REP که توالی های تکراری پالیندرومیک افزوده شده ژنومی^{۲۴۶} می باشند. [۲] توالی های ۱۲۴-۱۲۷ جفت بازی انتروباکتریال مجتمع داخل ژنومی به نام ERIC^{۲۴۷} [۳] جعبه ۱۵۴ جفت بازی یا BOX این توالی ها در مکان های متمایز و مشخص در طول ژنوم ظاهر می شوند. این عناصر تکراری می توانند در طول ژنوم به صورت دو جهتی^{۲۴۸} ظاهر می شوند و پرایمرها را برای PCR، می توان برای DNA با مبداء خارج از محل های توالی های تکراری برگردانده شده در REP و ERIC و BOXA که زیر واحدی از توالی های تکراری BOX است سنتز نمود و پروتکل های مشابه نیز به ترتیب انگشت نگاری ژنومی ERIC-PCR، REP-PCR و BOX-PCR نامیده می شوند که در مجموع انگشت نگاری ژنومی REP-PCR نامیده می شوند و قطعات و توالی های تقویت شده (توسط PCR) را می توان بر روی ژل به صورت پروفایل (تصویر عمودی) نشان داد [۲۰۹-۲۱۰].

۱-۲۹-۵ پالس فیلد ژل الکتروفورزیس (PFEG)^{۲۴۹}:

PFEG با کل DNA باکتریایی انجام می شود که با یکی از کیت های اختصاصی استخراج DNA صورت می گیرد و از آنزیم برش دهنده *XbaI* به عنوان آنزیم محدود الاثر استفاده می شود. قطعات Macrorestriction در مدت ۲۰ ساعت طبق دستور شرکت سازنده کیت از همدیگر جدا می شوند. ژل مورد مطالعه با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شده و عکس برداری می شود. نمونه های بالینی که در بیش از دو باند با همدیگر تفاوت دارند به عنوان یک کلونهای متفاوت در نظر گرفته می شوند [۲۱۰-۲۱۱].

^{۲۴۶} Repetative extragenic palindromic sequence
^{۲۴۷} Ersolonic bacterial repetitive intergene concensus
^{۲۴۸} Orintation
^{۲۴۹} Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFEG

۱-۲۹-۶ تعیین توالی:

توالی‌یابی، در علم ژنتیک و بیوشیمی، به معنی تعیین ساختار داخلی (نظیر ترتیب نوکلئوتیدهای سازنده دی‌ان‌ای) است. نتیجه‌ی این فرایند، دستیابی به توالی ساختارهای مختلف اتمی است که نمایانگر ساختار توالی مولکول در سطح اتمی می‌باشد. توالی‌یابی دی‌ان‌ای باید سه ویژگی داشته باشد ۱- مکمل بودن ۲- وارون بودن ۳- زوج نوکلئوتید بودن. انواع متنوعی از توالی‌یابی وجود دارد که عبارتند از: توالی‌یابی DNA، توالی‌یابی RNA، توالی‌یابی پروتئین، توالی‌یابی پلی‌ساکارید [۲۰۶-۲۰۴].

۱-۳۰ اپیدمیولوژی

چند ساعت پس از تولد، باکترهائی گروه کلی‌فرم در روده جایگزین و مستقر می‌گردند و قسمت اعظم فلور طبیعی باکتری‌های هوازی روده را تشکیل می‌دهند. تعداد باکتری‌های گونه‌های اشریشیاکلی در مجرای گوارشی بسیار زیاد است. گرچه می‌توانند به صورت فرصت طلب بیماری‌زا باشند زمانی که روده‌ها سوراخ شوند و باکتری‌ها وارد حفره صفاقی شوند، بیشتر اشریشیاکلی عامل بیماری گاستروانتریت و خارج روده‌ای می‌باشد به این علت آن‌ها فاکتورهای ویروالانس را توسط پلاسمیدها، جزایر پاتوژنیسیته و DNA باکتریوفاژها به دست می‌آورند. به دلیل اینکه اشریشیاکلی از بیماران سپسی جدا شده و همینطور مسئول ایجاد بیشتر از ۸۰ درصد عفونت‌های مجرای ادراری، اکتسابی-اجتماعی است و نیز مسئول بیشتر عفونت‌های اکتسابی بیمارستان می‌باشد، همچنین عامل غالب ایجادکننده گاستروانتریت در کشورهای در حال توسعه می‌باشد. بیشتر عفونت‌ها به استثناء مننژیت نوزادان و گاستروانتریت به صورت درون

زا^{۲۵۰} می باشند. به این معنی که باکتری به عنوان بخشی از فلور طبیعی میکروبی بدن است و در هنگام کاهش ایمنی بدن قادر به ایجاد عفونت می باشد [۲۱۲].

۱-۳۱ عفونت های بیمارستانی

ظهور مقاومت های آنتی بیوتیکی در باکتری های بیماری زا به ویژه در مراکز درمانی و بیمارستان ها به یک معضل بزرگ در درمان عفونت های جدی بیماران تبدیل شده است. برخی از باکتری ها قادر به تولید آنزیم های هستند که منجر به تغییر و یا تخریب ساختار شیمیایی آنتی بیوتیک ها و در نهایت سبب غیرفعال شدن آنتی بیوتیک و بروز فنوتیپ مقاومی از باکتری می شوند. بهترین مثال از این مقاومت ها، آنزیم های بتالاکتاماز می باشند که از طریق هیدرولیز کامل اکسی ایمینوبتالاکتام ها منجر به غیرفعال شدن گروه آنتی بیوتیک های بتالاکتام می شوند. در بین مقاومت های دارویی، مقاومت به داروهای ضد میکروبی بتالاکتام نگرانی اصلی برای درمان عفونت های میکروبی می باشد [۳-۱].

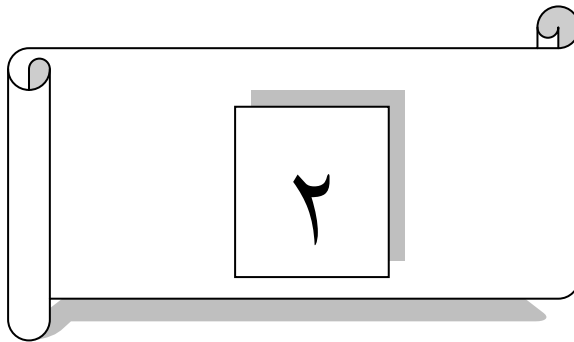
نرخ عفونت بیمارستانی در بخش مراقبت های ویژه در مقایسه با بخش های دیگر بیمارستان بالا است و شیوع آن در ICU بیشتر از سایر بخش های بیمارستان می باشد. بیماران بستری در ICU در معرض خطر بیشتری برای ابتلای به عفونت های بیمارستانی می باشند، لذا بخش های مراقبت ویژه از قسمت های خطیر بیمارستان می باشند و بیمارانی که در این بخش ها بستری می شوند دامنه وسیعی از اختلالات عملکردی و یا نقص در یک یا چند ارگان به ویژه سیستم های تنفسی و قلبی و عروقی دارند. از آنجایی که مداخلات تهاجمی و استفاده از کاتتر های وریدی و ادراری و دستگاه های کمک تنفسی به طور وسیع به کار گرفته می شود، خطر ابتلا به عفونت ها افزایش می یابد. این بخش ها به عنوان مخازن باکتری های ویرولان و اغلب فوق العاده مقاوم می باشند که اغلب از طریق دست پرسنل و یا وسایل پزشکی به

سهولت بین بیماران انتشار می یابند. از سوی دیگر مصرف بی رویه عوامل ضد میکروبی به کلونیزه شدن میکرو ارگانیسم های مقاوم منجر می گردد. باسیل های گرم منفی با مقاومت چند گانه از پاتوژن های مهم بخش های ICU می باشند، که سبب نرخ بالای مرگ و میر در بیماران بستری در این بخش ها می گردد. پیشگیری از عفونت ها برای افراد سالم در خارج از محیط بیمارستان، نگران کننده نمی باشد، اما به محدود کردن آلودگی محیط های مراقبت بهداشتی و پیشگیری از انتقال میکروب به بیماران بستگی دارد. برنامه های موثر کنترل عفونت های بیمارستانی برای شناسایی و ریشه کنی هر چه سریعتر منبع ارگانیسم، ضروری است. ایشیریشیا کلی ممکن است در آب مقطر، بعضی از مواد گندزدا، محلول های تزریقی جهت تغذیه بیماران و داروها رشد کند. در بخش های مراقبت های ویژه، عفونت عموماً از دست های پرسنل، سطوح سینک های شستشو، کاتترها و محلول های مورد مصرف برای آبکشی کاتترهای دستگاه ساکشن، به بیماران منتقل می گردد. توجه خاص به شستشوی دست ها، بویژه با یک محلول حاوی یدوفور (یددار)، قبل و بعد از تماس با بیماران ممکن است از ایجاد بیماری به صورت اپیدمیک، پیشگیری یا جلوگیری نماید. مراقبت شدید و استفاده از روش های استریل برای ساکشن کردن لوله های داخل تراشه یا اندوتراکئال، کار گذاری کاتترهای ممکن و مراقبت از آن ها، تهیه محلول های داخل وریدی بویژه انواعی که برای تغذیه کامل بیمار به صورت تزریقی به کار می روند و تعویض مرتب لوله های مخصوص برای تزریق داخل وریدی تا حدود زیادی، خطر آلودگی ارگانیسم های گرم منفی را کاهش می دهد [۵-۱].

۱-۳۲ درمان

درمان اختصاصی واحدی وجود ندارد. سولفونامید ها، آمپی سیلین، سفالوسپورین ها، فلوروکینولون ها و آمینو گلیکوزید ها، به طور مشخصی اثرات ضد میکروبی بر باکتری های روده ای دارند، اما حساسیت آنها نسبت به این داروها بسیار متفاوت است و تست های آزمایشگاهی برای سنجش حساسیت آنتی بیوتیکی

لازم است . مقاومت چند دارویی شایع می باشد و تحت کنترل پلاسمید های قابل انتقال است. با کشف و گسترش استفاده از بتالاکتام ها برای درمان عفونت ها، مقاومت به این آنتی بیوتیک ها نیز گسترش یافته است. با معرفی و استفاده گسترده از آنتی بیوتیک های بتالاکتام جدید همچون مزلوسیلین و پیراسیلین و سفالوسپورین های نسل سوم و چهارم (مثل سفوتاکسیم و سفتازیدیم و سفپیم) و کارباپنم ها که طیف اثر آنها در باکتری ها وسیع می باشد، ژن های مقاومت به آنها نیز در باکتری ها توسعه یافته است. بروز مقاومت اکثرا به خاطر ژن های بتالاکتامازی قرار گرفته بر روی عناصر ژنتیکی متحرک مثل ترنسپوزون ها یا پلاسمیدها ایجاد می شود که باعث بروز مشکلات فراوان در درمان عفونت های جدی بیماران در بیمارستان ها به- خصوص در بخش های مراقبت ویژه می گردد، حتی منجر به مرگ و میر بیماران نیز شده است. شکست در درمان بیماران به دلیل استفاده بی رویه و کنترل نشده این آنتی بیوتیک ها می باشد که باید در بیمارستان ها توسط بخش کنترل عفونت بر مصرف این آنتی بیوتیک ها نظارت گردد. بنابراین گسترش مقاومت به سفالوسپورین های نسل سوم و چهارم از معضلات بهداشتی و درمانی پیش رو می باشد که باید به آن توجه گردد [۲۱۲].



بخش دوم

مروری بر مطالعات

✓ Rubio-Prezez- و همکاران (۲۰۱۲) در طی یک مطالعه دو ساله در بیمارستان های مادرید برای تشخیص باکتری های مولد ESBLs انجام دادند. در این مطالعه *E.coli* به عنوان شایعترین پاتوژن و عفونت مجاری ادراری به عنوان شایعترین نوع عفونت و بخش های داخلی جراحی و بخش مراقبت های ویژه به عنوان شایعترین بخش های باکتری های مولد ESBLs تعیین گردیدند. نتایج مطالعه نشان داد، که ۲۱۹ بیمار دارای باکتری های مولد ESBLs بودند. ۱۵۸ (۷۲٪) از سویه ها *E.coli* می باشند [۲۱۳].

✓ Mobaiyen و همکاران در طول یک دوره یک ساله (۲۰۱۰-۲۰۰۹) وجود ژن های *bla*_{CTX-M}، *bla*_{TEM} و *bla*_{SHV} را در ۳۲ ایزوله اشریشیا کلی جدا شده از بیماران بستری در بخشهای مراقبت ویژه در بیمارستان امام رضا تبریز را مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که ۳۰ ایزوله (۹۳/۷٪) مولد ESBLs بودند. ۸۷/۵٪ واجد ژنهای *bla*_{TEM} و ۱۲/۵٪ *bla*_{SHV} و ۳۱/۲٪ *bla*_{CTX-M} را داشتند [۲۱۴].

✓ Meybeck و همکاران (۲۰۰۸) در فرانسه ارزیابی میزان بروز و تاثیر مقاومت به پپراسیلین /تازوباکتام (PIP-TAZ) در سویه های *E.coli* را در طی یک مطالعه دو ساله کوهورت گذشته نگر (Retrospective) در ICU بیمارستان Colombes فرانسه را طی سال های (۲۰۰۲-۲۰۰۴) بررسی کردند. از ۸۳ سویه *E.coli* ۱۳ (۱۵/۷٪) سویه مقاوم به پپراسیلین -تازوباکتام (PIP-TAZ) و ۲ (۲/۰۴٪) مولد (ESBLs) بوده و ۷ (۵۴٪) از سویه های مقاوم به (PIP-TAZ) قبلاً درمان آنتی بیوتیکی Amoxicillin یا Amoxicillin-Clavulanat دریافت کرده بودند [۲۱۵].

✓ Chaiwarith و همکاران (۲۰۱۱) در طی یک پریود زمانی ۳ ساله (۲۰۰۶-۲۰۰۹) در میان پاتوژن

های باکتریایی جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان چیانگ مای تایلند مقاومت چند دارویی را مورد بررسی قرار دادند. در طی این مطالعه از ۲۴۷۶۱ پاتوژن گرم منفی ۶۱۰۰ (۲۴/۶٪) ایزوله مربوط به باکتری *E.coli* بوده و *E.coli* به عنوان شایعترین پاتوژن جدا شده از خون و ادرار مشخص گردید. در این مطالعه ۴٪ از ایزوله ها مربوط به بخش مراقبت های ویژه بود. بر اساس داده های بدست آمده در این مطالعه فراوانی *E.coli* های مولد ESBLs طی سال های ۲۰۰۶ الی ۲۰۰۹ از ۳۵/۲٪ به ۵۳/۲٪ بطور تاسف باری افزایش پیدا کرده است [۲۱۶].

✓ Yang Hsu و همکاران (۲۰۰۶) در طی یک مطالعه یک ساله شیوع مقاومت های چند دارویی را در ۶ بیمارستان سنگاپور را مورد بررسی قرار دادند. از ۲۲۵۷ ایزوله اشریشیا کلی مقاوم به سفالوسپورین های نسل سوم ۱۲۳ (۵/۴۵٪) ایزوله از بخش های مراقبت ویژه جدا شده بود [۲۱۷].

✓ Martinez و همکاران در سال ۲۰۱۱ از والدپار در کلمبیا از ۱۰۲ ایزوله اشریشیاکلی جدا شده از نمونه های ادرار ارسالی به آزمایشگاه را از نظر وجود ESBLs مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که ۱۱/۷٪ از ایزوله ها (۱۲ نمونه) واجد ژن های ESBLs می باشد. نشان دادند که ۵۸٪ (۷ تا نمونه) واجد ژن های *bla*_{CTX-M} و ۵۸٪ (۷ تا نمونه) واجد ژن *bla*_{TEM} بودند [۲۱۸].

✓ Shahcheraghi و همکاران در مطالعه (۲۰۰۷) که بر روی ۲۶۰ سویه اشریشیاکلی از نمونه های بالینی مختلف در تهران صورت گرفت، ۴۸/۸٪ دارای ژن ESBLs بودند که ۶۳ ایزوله (۲۴/۲۳٪) از سویه ها دارای ژن *bla*_{TEM} و ۱۵ ایزوله (۵/۷۷٪) از سویه ها دارای ژن *bla*_{SHV} بودند [۲۱۹].

✓ Kalantar و همکاران در سال های ۲۰۰۷-۲۰۰۸، وجود ژن های *bla*_{TEM}، *bla*_{SHV} و *bla*_{CTX-} را در ۱۳۸ ایزوله اشریشیاکلی جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان کرمان مورد بررسی قرار دادند و

نشان دادند که ۶۸٪ از ایزوله‌ها مولد ESBLs بودند، که به ترتیب ۶۳/۸٪، ۵۱٪ و ۲۳/۴٪ از ایزوله‌ها واجد ژن‌های فوق‌الذکر بودند [۲۲۰].

✓ Gupta و Sharma (۲۰۱۲) طی یک مطالعه ۶ ماهه (۲۰۱۰-۲۰۱۱) گذشته‌نگر (Retrospective) در بمبئی هند، شیوع باکتری‌های مولد ESBLs و مقاوم به سفیپم-تازوباکتام را مورد بررسی قرار دادند. از ۱۰۰۹ باکتری‌های گرم منفی جدا شده بیشترین ایزوله‌ها با ۷۰/۸٪ (۷۰/۱۸٪) از بخش ICU جدا شد. از میان ۲۲۸ ایزوله *E. coli* جدا شده، ۱۷۹ سویه مولد ESBLs (۷۸/۵۰٪) بودند [۲۲۱].

✓ Nazik و همکاران (۲۰۱۱) در طی یک مطالعه شیوع بتالاکتاماز تیپ CTX-M در اشریشیا کلی مولد ESBLs را در ترکیه مورد بررسی قرار دادند. نتایج مطالعه نشان داد از ۲۱۹ سویه جمع‌آوری شده *E. coli* مولد ESBLs (۲۰۰۶-۲۰۰۷)، ۱۹۰ (۸۷٪) سویه دارای ژنوتیپ CTX-M بوده و ۸۷٪ سویه‌ها مقاوم به امپی‌سیلین-سولباکتام، ۷۷٪ ایزوله‌ها مقاوم به اموکسی‌سیلین-کلاولونیک‌اسید، ۷۶٪ سویه‌ها مقاوم به کوتریموکسازول، ۷۰٪ سویه‌ها مقاوم به نوروفلوکساسین، ۶۸٪ سویه‌ها مقاوم به سیپروفلوکساسین، ۵۱٪ سویه‌ها مقاوم به جنتامایسین، می‌باشند. نتایج حاصل، افزایش قابل توجه شیوع *bla* CTX-M را در سویه‌های *E. coli* را در طی سال‌های ۲۰۰۶ الی ۲۰۰۷ را نشان داده است (از ۷۴٪ به ۹۳٪، P:0/001) [۱۵۴].

✓ Hernandez- و همکاران (۲۰۰۵) طی یک مطالعه از ۴۰ مرکز در اسپانیا به مدت ۴ ماه، انتشار کلونال بتالاکتامازهای با طیف گسترده (ESBLs) در ۱۷۰ نمونه *E. coli* جدا شده از این مراکز را مورد بررسی قرار دادند. شایع‌ترین ژنوتیپ‌ها *bla* CTX-M-9 (۲۷/۳٪)، *bla* CTX-M-12 (۲۳/۹٪)، *bla* CTX-M-14 (۲۰/۵٪) برای *E. coli* گزارش شده است [۲۲۲].

✓ Rudresh و Nagarathnamma (۲۰۰۹) طی یک مطالعه حضور ESBLs را در ایزوله های انتروباکتریاسه در بیمارستان های ویکتوریا و بنگلور هندرا مورد بررسی قرار دادند. از میان ۲۳۹ ایزوله انتروباکتریاسه جدا شده که اکثرا متعلق به بخش مراقبت های ویژه بودند ، ۱۴۹ (۶۲/۳٪) ایزوله مولد ESBLs بودند و تمامی آنها به سفوکسیتین مقاوم تشخیص داده شد. از ۹۶ ایزوله *E.coli* نیز ۶۵ (۶۷/۷٪) ایزوله مولد ESBLs شناخته شد [۲۲۳].

✓ Meyer و همکاران (۲۰۱۰) در المان در طی یک دوره ۷ ساله (۲۰۰۸-۲۰۰۱) افزایش تاسف بار مصرف سفالوسپورین های نسل سوم در واحدهای بخش مراقبت های ویژه ۵۳، ICU فعال در ۳۰ بیمارستان المان را مورد بررسی قرار دادند. و نتایج حاصل افزایش قابل توجه سویه های *E.coli* مقاوم به سفالوسپورین های نسل سوم را نشان داد. در طی مطالعه ۱۸۴۲۵ سویه *E.coli* مورد بررسی قرار گرفت. و نتایج نشان داد که مقاومت به سفالوسپورین های نسل سوم به ترتیب طی سال های ۲۰۰۱ الی ۲۰۰۸ از ۱/۲٪ به ۱۰/۵٪ افزایش پیدا کرده است [۲۲۴].

✓ Tashakori و همکاران (۱۳۸۹) در یک مطالعه توصیفی در طی ۵ ماه تعداد ۱۴۶ ایزوله ارو پاتوژن *E.coli* جدا شده از ۱۶۳۴ نمونه ادرار مشکوک به عفونت ادراری را در رفسنجان مورد بررسی قرار دادند. مجموعا ۲۹ (۸۶/۱۹٪) ایزوله از ۱۴۶ ایزوله نسبت به سفالوسپورین های نسل سوم مقاومت نشان دادند که ۱۵ (۱۰/۲۷٪) آنها از نظر تولید انزیم بتالاکتاماز مثبت بودند. تمامی سویه ها، نسبت به انتی بیوتیک های مروپنم-ایمپنم حساسیت نشان دادند [۲۲۵].

✓ Mohajeri و همکاران (۱۳۹۰) در طی مطالعه ای که بر روی ۲۰۰ ایزوله *E.coli* عامل بروز عفونت ادراری در شهر کرمانشاه انجام دادند. میزان حساسیت به ایمپنم را ۱۰۰٪ و میزان مقاومت به سفالوسپورینهای نسل سوم بین ۶۳-۷۵٪ را گزارش کردند. با استفاده از روش فنونپی Double

Disk Synergy ۵۴ (۲۷٪) سویه از ایزوله های موردبررسی را مولد ESBLs گزارش کردند

[۲۲۶].

✓ Mohammadimehr و همکاران (۱۳۸۹) در ایران یک مطالعه توصیفی و مقطعی به مدت یک سال

عفونت های بیمارستانی را در بخش مراقبت ویژه بیمارستان های خانواده و گلستان ارتش را مورد

بررسی قرار دادند. از ۱۰۱ باسیل گرم منفی عامل عفونت بیمارستانی در ICU، اشریشیاکلی با

۳۶ (۳۵/۶۴٪) ایزوله به عنوان شایعترین ارگانیزم پاتوژن جدا شده بود وبا استفاده از روش دیسک

دیفیوژن مقاومت ایزوله های *E.coli* به جتتامایسین (۲۷/۷۷٪)، سفوتاکسیم کلاونیک اسید (۳۳/۳۳٪)،

سفتازیدیم کلاونیک اسید (۵۸/۳۳٪)، پیراسیلین تازوباکتام (۳۶/۱۱٪)، امپی سیلین (۸۰/۵۵٪)،

سفوتاکسیم (۶۱/۱۱٪)، سفتازیدیم (۶۳/۸۹٪)، سفپییم (۶۶/۶۶٪) سفتریاکسون (۶۳/۸۸٪) و ایمپینم

(۸/۳۳٪) گزارش گردید [۲۲۷].

✓ Behrozi و همکاران (۱۳۸۹) در ایران طی یک مطالعه ۴ ماهه (۱۳۸۷-۱۳۸۸) میزان شیوع انزیم های

بتالاکتاماز با طیف گسترده (ESBLs) در *E.coli* جدا شده از نمونه های ادراری در بیمارستان میلاد

تهران مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه برای تعیین سویه *E.coli* مولد انزیم بتالاکتاماز گسترده

طیف از روش دیسک ترکیبی مطابق با دستور العمل CLSI استفاده گردید. از ۷۳۵ سویه باکتری گرم

منفی جدا شده اشریشیاکلی با ۶۲۰ (۸۴/۳۵٪) ایزوله به عنوان شایعترین پاتوژن تعیین گردید و از این

میان ۱۳۲ (۲۱٪) سویه مولد انزیم بتالاکتاماز (ESBLs) بودند در میان سویه های اشریشیاکلی

بیشترین میزان مقاومت به انتی بیوتیک های (Cefazolin ، Ceflizoxime ، Cefalotine ،

Ampicillin ، Carbenicillin ، Ceftizoxime ، ۹۸/۹۹٪ و کمترین میزان مقاومت به انتی

بیوتیک نیترو فورانتوئین (۲۰٪) گزارش گردید [۲۲۸].

✓ Soltan Dallal و همکاران (۱۳۸۹) و (۱۳۹۰) برای بررسی فروانی ژن های بتالاکتاماز با طیف

وسیع در ایزوله های بالینی *E.coli* از گروه *bla*_{TEM} و *bla*_{CTX-M-I} انجام دادند. از ۲۰۰ ایزوله *E.coli* جدا شده ۱۲۸ (۶۴٪) سویه ها از طریق تست های فنوتیپی دیسک دیفیوژن غربالگری شده به منظور تایید تولید ESBLs به روش فنوتیپی Combined disk مورد ارزیابی قرار گرفتند. که از این میان ۱۱۵ (۵۷/۵٪) سویه های اشریشیاکلی مولد ESBLs بوده و ۷۴ (۶۴/۳٪) ایزوله از آنها حاوی ژن های *bla*_{TEM} و ۹۹ (۸۶/۰۸٪) حاوی ژن *bla*_{CTX-M-I} تشخیص داده شد [۲۲۹].

✓ Yazdi و همکاران (۱۳۹۰) در ایران در یک دوره ۸ ماهه از بهمن ۱۳۸۸ تا شهریور ۱۳۸۹ طی یک مطالعه شیوع ژن های *bla*_{TEM}، *bla*_{CTX-M} و *bla*_{SHV} در *E.coli* مورد بررسی قرار دادند. تعداد ۲۴۶ ایزوله *E.coli* از بیمارستانهای تهران مورد بررسی قرار گرفت. ۱۱۶ ایزوله (۴۷/۱٪) مقاوم به سفنازیدیم و ۹۶ (۳۹/۲٪) ایزوله مقاوم به سفوتاکسیم بودند. همچنین ۱۰۹ (۴۴/۳٪) ایزوله مولد ESBLs بودند. ژن های *bla*_{TEM}، *bla*_{CTX-M} و *bla*_{SHV} به ترتیب در ۹۵ (۸۷/۱٪)، ۷۵ (۶۸/۸٪) و ۷۷ (۷۰/۶٪) ایزوله های مولد ESBLs یافت شد. ۴۰ نمونه (۳۶/۶٪) حاوی هر سه ژن مورد نظر بودند. علاوه بر این ۶۸ نمونه (۶۲/۳٪) واجد دو ژن *bla*_{TEM}، *bla*_{SHV}، ۶۱ نمونه (۵۵/۹٪) و ۵۴ نمونه (۴۹/۵٪) واجد دو ژن *bla*_{CTX-M}، *bla*_{SHV} بودند [۲۳۰].

✓ Panahi و همکاران (۱۳۸۷) در ایران در طی یک مطالعه ۱ ساله (۱۳۸۵-۱۳۸۴) ۱۰۰ بیمار عفونی با علائم سندرم پاسخ التهابی سیستمیک (SRIS) بستری در بخش مراقبت ویژه را مورد بررسی قرار دادند. بیماران مورد مطالعه دارای سن بیش از ۱۸ سال و سوند ادراری داخلی بودند. نتایج نشان داد ۶ (۶٪) ایزوله های اشریشیاکلی بود که به سفنازیدیم و سفتریاکسون به ترتیب با حداقل غلظت مهار (MIC>32 و MIC>64) مقاوم بودند [۲۳۱].

✓ Razazi و همکاران (۲۰۱۲) در فرانسه در یک پریود زمانی ۸ ماهه از ۶۱۰ بیمار بستری در ICU از

۵۳۱ (۸۷٪) بیمار نمونه سواب رکتال گرفتند و ۸۲

(۱۵٪) بیمار دارای ایزوله های انتروباکتریاسه مولد ESBLs بودند. قسمت اعظم این ایزوله ها ۵۱

(۶۲٪) را اشریشیاکلی تشکیل می داد [۲۳۲].

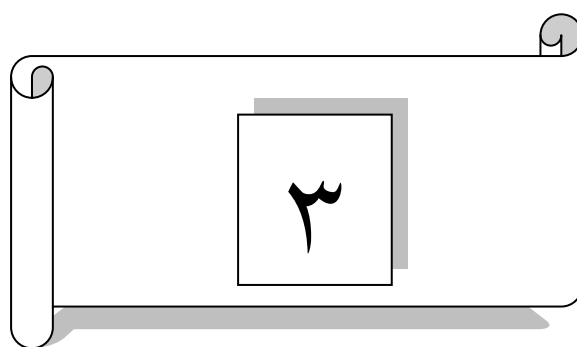
✓ Hariss و همکاران در مطالعه ای به منظور تعیین عوامل خطر ساز کلونیزاسیون باکتری های مولد

ESBLs در بیماران پذیرفته شده در ICU که در طی یک مطالعه ۳/۵ ساله آینده نگر (Cohort) که

در ICU های مرکز بیمارستان دانشگاه مریلند امریکا صورت گرفت. مشخص گردید از ۵۲۰۹ بیمار

وارد شده در این مطالعه ۷۶ بیمار (۱/۴۶٪) با سویه های *E.coli* مولد ESBLs کلونیزه شده

اند [۲۳۳].



بخش سوم

مواد و روش ها

۳- اهداف و فرضیات

۳-۱-۱ هدف اصلی (General Objective):

تعیین فراوانی ژن های bla_{SHV} و bla_{TEM} ، $bla_{CTX-M-I}$ در ایزوله های یوروپاتوژن اشريشيا کلي مولد بتا لاکتاماز های با طیف گسترده (ESBLs) در بیماران بستری در بخش های مراقبت ویژه ی بیمارستان های قزوین، تهران و کرج

۳-۱-۲ اهداف فرعی (Specific Objectives):

- تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی گونه های *E.coli* با روش دیسک آگار دیفیوژن مطابق با روش استاندارد CLSI.
- غربالگری فنوتیپی برای تعیین سویه های انتخاب شده مولد ESBLs مطابق با استاندارد پیشنهادی CLSI.
- تعیین آنزیم های ESBLs با روش تاییدی فنوتیپی Combined Disk برای ایزوله های انتخاب شده در غربالگری
- تعیین فراوانی ژن های bla_{SHV} و bla_{TEM} ، $bla_{CTX-M-I}$ در ایزوله های *E.coli* جدا شده از نمونه های ادرار بیماران بستری در ICU.
- مقایسه نتایج فنوتیپیک با نتایج ژنوتیپیک در ارتباط آنزیم های ESBLs.
- تعیین فراوانی گونه های *E.coli* مولد ESBL و ژن های bla_{SHV} و bla_{TEM} ، $bla_{CTX-M-I}$ بر حسب شهر و بیمارستان.

۳-۱-۳ اهداف کاربردی (Applied Objectives): از آنجایی که الگوی مقاومت دارویی دارای

توزیع جغرافیایی، منطقه ای و حتی بیمارستانی می باشد. لذا تعیین الگوی مقاومتی سویه های *E.coli* و جدا شده از عفونت های بیمارستانی به ویژه بخش مراقبت های ویژه به روش فنوتیپی و تعیین فاکتور های ژنتیکی آن در این سویه هامی تواند در تعیین رژیم درمانی مناسب برای بیماران و ارایه نتایج آن به کمیته های کنترل عفونت بیمارستان ها از جهت کنترل سویه های دارای مقاومت چند گانه و همچنین بررسی های اپیدمیولوژی موثر باشد. از آنجایی که آنزیم های ESBLs اکثرا پلاسمیدی و قابلیت انتقال را دارند و به راحتی می توانند سبب بروز مقاومت به آنتی بیوتیک های بتالاکتام به ویژه مقاومت به نسل سوم و چهارم سفالوسپورین ها گردند و به راحتی سبب انتشار این نوع مقاومت به شکل افقی و عمودی می گردند.

۳-۱-۴ فرضیه ها یا سوال های پژوهشی (Hypothesis):

- فراوانی مقاومت به سفالوسپورین های با طیف اثر گسترده در بین ایزوله های *E.coli* جدا شده از نمونه های ادرار بیماران بستری ICU چگونه است ؟
- فراوانی ژن *bla* SHV , *bla* TEM و *bla* CTX-M-I در بین ایزوله های *E.coli* جدا شده از نمونه های ادرار بیماران بستری در ICU چگونه است ؟
- آیا تفاوتی میان نتایج تست های فنوتیپی تشخیص ESBLs با نتایج به دست آمده از روش های مولکولی برای تشخیص ژن های مولد ESBLs وجود دارد؟

۳-۲ مواد و روش ها

۳-۲-۱ نوع مطالعه و انتخاب افراد مورد مطالعه

نوع مطالعه توصیفی بوده و معیار ورود به مطالعه شامل:

- نمونه های ارسالی که از نظر رشد گونه های اشریشیاکلی مثبت باشد.

۳-۲-۲ معیارهای خروج از مطالعه نیز شامل موارد زیر می باشد:

- نمونه های غیر تکراری ارسالی که نتیجه کشت آنها از سایر باکتری های بجز گونه های اشریشیاکلی باشد.

- نمونه بیمارانی که نمونه های ارسالی آنان تکراری باشد.

- نمونه بیمارانی که نمونه های ارسالی آنان از سایر بخش ها به جز ICU باشد.

- نمونه بیمارانی سرپایی

۳-۲-۳ جامعه مورد مطالعه و روش محاسبه و روش نمونه گیری:

جمعیت مورد مطالعه عبارت از ایزوله های *E.coli* جدا شده از نمونه های ارسال شده به آزمایشگاه میکروب شناسی از بیماران بستری در بخش های مراقبت ویژه در بیمارستان های شهرهای تهران، قزوین و کرج است . جهت برآورد حجم نمونه از فرمول برآورد نسبت استفاده میشود. بر اساس پارامترهای آماری تعیین حجم نمونه، تعداد نمونه های این مطالعه ۱۵۷ نمونه می باشد. این عدد با توجه به شیوع 80 درصد ژن مقاومت و ضریب اطمینان 95 درصد و $\alpha = 0.05$ دقت 0.07 حجم نمونه 157 بدست می آید. ایزوله های اشریشیاکلی جداسازی شده جهت انجام مراحل تحقیق در فریزر $^{\circ}C -70$ نگهداری خواهد شد.

$$n = \frac{Z_{1-\alpha/2}^2 \times P \times (1 - P)}{d^2} = 157$$

جدول ۳-۱. متغیرها:

عنوان متغیر	مستقل	وابسته	کمی		کیفی		تعریف علمی	مقیاس
			پیوسته	گسسته	اسمی	رتبه ای		
نوع نمونه کلینیکی	×				×		براساس نوع نمونه ایی که سویه <i>E.coli</i> از آن جدا می شود	نوع نمونه کلینیکی
نوع بیمارستان	×				×		بیمارستان های قزوین ، کرج و تهران	
مقاومت به آنتی بیوتیک ها		×			×		براساس نتایج آنتی بیوتیک ها ، مطابقت آن با جداول CLSI	حساس / حد واسط مقاوم / مثبت
آزمون تایید ESBLs		×			×		براساس نتایج دیسک دیفیوژن و دیسک ترکیبی ، اندازه منطقه عدم رشد و مطابقت با جداول CLSI	مثبت و منفی
حضور ژن های <i>bla</i> _{CTX-M-1} ، <i>bla</i> _{TEM} ، <i>bla</i> _{SHV}	×				×		براساس نتایج PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی هر ژن	دارد / ندارد

۳-۳ جمع آوری نمونه

تعداد ۲۱۰ ایزوله اشريشياکلی، در یک پریود زمانی یکساله، از فروردین سال ۱۳۹۲ تا فرودین ۱۳۹۳، نمونه های ادرار از بیماران بستری در بخش های مراقبت ویژه از بیمارستان های شهرهای تهران، قزوین و کرج جمع آوری شدند. نمونه های ادرار در آزمایشگاه های بیمارستان ها بر روی دو محیط پایه بلاد آگار و مک کانگی آگار کشت داده شده و پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد، توسط آزمایش های بیوشیمیایی مربوط به شناسایی گونه اشريشياکلی مورد بررسی قرار گرفته و تعیین هویت شدند. سپس مجددا ایزوله ها پاساژ داده شده و به گروه میکروب شناسی و مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی دانشگاه علوم پزشکی قزوین انتقال داده شدند و برای اطمینان از نوع باکتری از تست های بیوشیمیایی جهت تعیین هویت مجدد، استفاده شد.

۳-۴ آزمایش های تشخیصی فنوتیپی تعیین هویت

تست های بیوشیمیایی که برای شناسایی اشريشياکلی مورد استفاده قرار گرفتند عبارتند از:

۱. کشت بر روی محیط مکانکی و ائوزین متیل بلو آگار

۲. رنگ آمیزی گرم و بررسی میکروسکوپی

۳. انجام آزمون اکسیداز و کاتالاز

۴. کشت بر روی محیط TSI

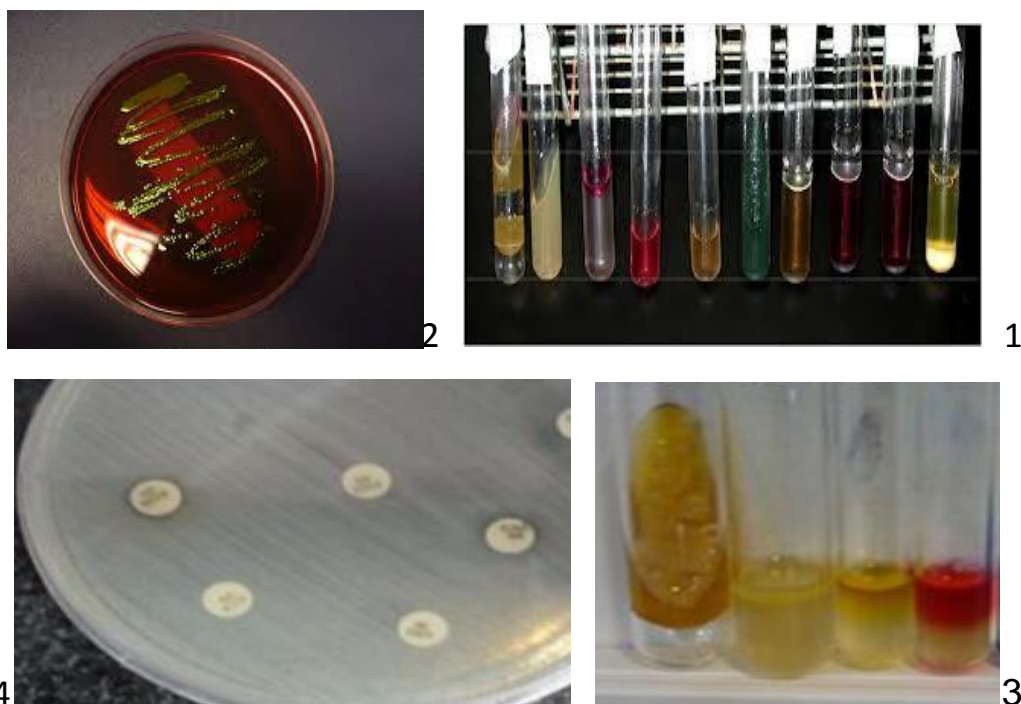
۵. آزمایش متیل رد (کشت بر روی محیط MRVP)

۶. آزمایش ووگس پروسکوئر (کشت بر روی محیط MRVP)

۷. کشت بر روی محیط SIM (جهت بررسی اندول، حرکت و سولفید هیدروژن)

۸. کشت بر روی محیط سیمون سیترات

۹. لی. زین کربوکس. یلاز [۱۴۷].



شکل ۱-۳. نتایج تست های بیوشیمیایی: شکل ۱ و ۳: آزمون MRVP، Indole، سیترات، TSI، اوره.

۲: رشد و تولید پیگمان در EMB، ۴: کشت بر روی محیط مولر هیتون آگار و نتایج کشت آنتی بیوگرام

ایزوله اشريشيا کلي

اشريشيا کلي همان گونه که گفته شد باسيل گرم منفي، اکسيداز منفي، لاکتوز مثبت است که در محیط TSI، توليد اسيد و گاز مثبت، می باشد و واکنش مثبت اسیدی زرد رنگ در سطح و عمق محیط دیده می شود، در سطح و عمق محیط واکنش دارد و توليد گاز از گلوکز مثبت می باشد. در محیط کشت SIM، حرکت مثبت، از نظر آزمون توليد H_2S منفي و اندول مثبت می باشد. آزمون سیترات منفي است. رشد

بر روی محیط MRVP، آزمایش متیل رد مثبت و آزمایش ووگس پروسکوئر منفی می باشد. لیزین دکربوکسیلاز مثبت و کشت بر روی محیط اوره منفی می باشد [۱۷۵ و ۱۴۷]. بعد از تعیین هویت ایزوله ها به منظور نگه داری طولانی مدت باکتری ها، ابتدا آن ها را در ویال های کرایوتیپ های حاوی ۱/۵ سی سی محیط تریپتی کیز سوی براث^{۲۵۱} کشت داده و بعد از انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۸ ساعت، در صورت رشد باکتری و ایجاد کدورت در محیط ویال ها حاوی ۱۵٪ گلیسرول به دمای ۲۰- درجه سانتیگراد و ۷۰- درجه سانتیگراد منتقل می شود، برای هر نمونه دو عدد کرایوتیوپ تخصیص می دهیم و سپس تا زمان انجام تست های مطالعه یکی از کرایوتیوپ ها را در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد و دیگری را در فریزر ۷۰- درجه سانتی گراد نگه داری می کنیم.

۳-۵ تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی

روش دیسک دیفیوژن، روشی است که برای تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی به طور وسیع در اغلب آزمایشگاه ها استفاده می شود و انجام آن ساده است.

مواد و وسایل مورد نیاز جهت انجام آزمایش:

۱. محیط کشت مولر هینتون آگار
۲. دیسک های آنتی بیوتیک
۳. نیم مک فارلند
۴. سویه اشیریشیاکلی ۲۵۹۲۲ ATCC
۵. سوآپ پنبه ای استریل
۶. پلیت های یکبار مصرف ۱۰ سانتی متری

^{۲۵۱} TSB Broth

۷. لوله های حاوی ۲ تا ۳ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل

۸. خط کش ، پنس، ماسک، دستکش و مازیک

برای انجام آزمون از دستور العمل مؤسسه بین المللی استانداردهای آزمایشگاهی^{۲۵۲} استفاده شد و به شرح زیر انجام شد [۱۴۷ و ۱۷۵].

I ابتدا محیط مولر هیتون آگار تهیه شد و pH آن بین ۷/۲ تا ۷/۴ تنظیم گردید. این پلیت ها، برای کنترل آلودگی به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد انکوبه شدند.

II در مرحله بعد برای انجام آزمون، ظروف حاوی دیسک های ایمپنم ($10\mu\text{g}$)، سفتازیدیم ($30\mu\text{g}$)، سفیم ($30\mu\text{g}$)، ازترونام ($10\mu\text{g}$)، سفپودوکسیم ($30\mu\text{g}$)، سفتریاکسون ($30\mu\text{g}$)، سفوکسیتین ($30\mu\text{g}$) و سفوتاکسیم ($30\mu\text{g}$) متعلق به شرکت MAST انگلیس بود. از فریزر ۲۰ - درجه سانتی گراد (نگهداری بلند مدت) به یخچال ۴ درجه سانتی گراد (نگهداری کوتاه مدت) انتقال داده شدند. چند دقیقه قبل از انجام تست نیز ظروف حاوی دیسک ها در محیط آزمایشگاه قرار گرفتند تا به دمای اتاق برسند.

III در مرحله بعد سوسپانسیون میکروبی استاندارد جهت انجام آزمون تهیه شد. از آن جا که برای تهیه سوسپانسیون، از سویه هایی که بیش از ۲۴ ساعت از کشت آن ها نگذشته باشد استفاده می شود، لذا نمونه ها یک روز قبل از انجام آنتی بیوگرام بر روی محیط نوترینت آگار کشت داده شدند. سپس در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۸-۱۶ ساعت انکوبه شدند. حدود ۳-۵ کلونی کلونی را به لوله حاوی ۲ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل انتقال داده و

بعد از مخلوط کردن با ورتکس، کدورت سوسپانسیون به دست آمده با کدورت نیم مک فارلند تطبیق داده شد.

IV. سوآب پنبه ای استریل به درون سوسپانسیون باکتریایی آماده شده غوطه ور شده و سپس بعد از فشردن سوآب به دیواره جانبی لوله آزمایش برای تخلیه مایه اضافی، بر روی محیط کشت مولر هیتتون آگار به صورت چمنی کشت داده و با عوض کردن زاویه کشت و چرخاندن سوآب تمامی سطح سه بار کشت می دهیم. ۱۵ دقیقه پس از تلقیح سوسپانسیون دیسک های آنتی بیوتیکی ذکر شده که به دمای اتاق رسیده بودند، بر روی پلیت به فاصله مناسب از یکدیگر (دو سانتی متر از دیسک مجاور) و همچنین از لبه پلیت به فاصله یک و نیم سانتی متر از لبه پلیت) جای گذاری شدند. پس از قرار دادن دیسک ها پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ سانتی گراد انکوبه شدند. سپس با استفاده از خط کش، قطر هاله عدم رشد اطراف هر دیسک اندازه گیری و نتایج مربوطه در فرم های تهیه شده ثبت شدند.

در این مطالعه مطابق با پیشنهاد CLSI برای کنترل کیفی دیسک های آنتی بیوتیکی از سویه استاندارد اشریشیاکلی ۲۵۹۲۲ ATCC به عنوان سویه کنترل، و برای کنترل کیفی محیط کشت مولر هیتتون آگار از سویه استاندارد انتروکوکوس فکالیس ۲۹۲۱۲ ATCC استفاده گردید [۱۷۵ و ۱۴۷].

۳-۶ بررسی فنوتیپی حضور بتالاکتامازهای وسیع الطیف در دو مرحله صورت گرفت:

۳-۶-۱ غربالگری ESBLs:

در مرحله اول، تست حساسیت آنتی بیوتیکی نسبت به آنتی بیوتیک های سفتازیدیم، سفوتاکسیم، ازترونام، سفپودوکسیم و سفتریاکسون طبق دستور العمل CLSI، ایزوله هایی که قطر هاله عدم رشد دیسک

سفتازیدیم ($30\mu\text{g}$) ≥ 22 میلی متر، سفیدوکسیم ($10\mu\text{g}$) ≥ 17 میلی متر، دیسک سفتریاکسون ($30\mu\text{g}$) ≥ 25 میلی متر، دیسک سفوتاکسیم ($30\mu\text{g}$) و دیسک ازترونام ($30\mu\text{g}$) ≥ 27 میلی متر بودند به عنوان ارگانیزم های بالقوه تولید کننده ESBL در نظر گرفته شده و تست تاییدی فنوتیپی دیسک ترکیبی برای آنها انجام گرفت (جدول ۳-۳ و ۳-۲).

جدول ۳-۲ غربالگری ESBLs [۱۷۵ و ۱۴۷].

Test	Initial Screen Test		Phenotypic Confirmatory Test	
Test method	Disk diffusion	Broth microdilution	Disk diffusion	Broth microdilution
Medium	MHA	CAMHB	MHA	CAMHB
Antimicrobial concentration	For <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i> , and <i>E. coli</i> : Cefpodoxime 10 μg or Ceftazidime 30 μg or Aztreonam 30 μg or Cefotaxime 30 μg or Ceftriaxone 30 μg For <i>P. mirabilis</i> : Cefpodoxime 10 μg or Ceftazidime 30 μg or Cefotaxime 30 μg (The use of more than one antimicrobial agent for screening improves the sensitivity of ESBL detection.)	For <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i> , and <i>E. coli</i> : Cefpodoxime 4 $\mu\text{g/mL}$ or Ceftazidime 1 $\mu\text{g/mL}$ or Aztreonam 1 $\mu\text{g/mL}$ or Cefotaxime 1 $\mu\text{g/mL}$ or Ceftriaxone 1 $\mu\text{g/mL}$ For <i>P. mirabilis</i> : Cefpodoxime 1 $\mu\text{g/mL}$ or Ceftazidime 1 $\mu\text{g/mL}$ or Cefotaxime 1 $\mu\text{g/mL}$ (The use of more than one antimicrobial agent for screening improves the sensitivity of ESBL detection.)	Ceftazidime 30 μg Ceftazidime-clavulanic acid* 30/10 μg <u>and</u> Cefotaxime 30 μg Cefotaxime-clavulanic acid 30/10 μg (Confirmatory testing requires use of both cefotaxime and ceftazidime, alone and in combination with clavulanic acid.)	Ceftazidime 0.25–128 $\mu\text{g/mL}$ Ceftazidime-clavulanic acid 0.25/4–128/4 $\mu\text{g/mL}$ <u>and</u> Cefotaxime 0.25–64 $\mu\text{g/mL}$ Cefotaxime-clavulanic acid 0.25/4–64/4 $\mu\text{g/mL}$ (Confirmatory testing requires use of both cefotaxime and ceftazidime, alone and in combination with clavulanic acid.)
Inoculum	Standard disk diffusion recommendations	Standard broth dilution recommendations	Standard disk diffusion recommendations	Standard broth dilution recommendations
Incubation conditions	35 \pm 2°C; ambient air	35 \pm 2°C; ambient air	35 \pm 2°C; ambient air	35 \pm 2°C; ambient air
Incubation length	18–18 hours	18–20 hours	18–18 hours	18–20 hours

۳-۶-۲ تست تاییدی فنوتیپی دیسک ترکیبی ESBLs:

در مرحله دوم، ایزوله هایی دارای کاهش حساسیت نسبت به هر کدام از انتی بیوتیک های مرحله غربالگری توسط تست تاییدی تولید ESBLs به روش دیسک ترکیبی مورد بررسی قرار گرفتند. در این از مون از دیسک های سفتازیدیم و سفتازیدیم /کلاولانیک اسید، سفوتاکسیم و سفوتاکسیم/کلاولانیک اسید استفاده می شود. نتایج طبق دستور العمل CLSI تفسیر گردید، بدین صورت که اگر افزایش قطر هاله عدم رشد

دیسک ترکیبی معادل $\geq 5\text{mm}$ در مقایسه با قطر هاله عدم رشد دیسک به تنهایی باشد آن ایزوله به عنوان سویه مولد ESBLs در نظر گرفته می شود. برای انجام این تست هم پلیت حاوی محیط مولر هیتون اگر مانند تست آنتی بیوگرام به صورت چمنی توسط سواب اغشته به سوسپانسیون میکروبی تهیه شده با کدورت نیم مک فارلند کشت داده می شود و دیسک ها بر روی قرار داده شده و بعد از ۱۸-۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد نتایج خوانده می شود. در آزمون تاییدی از سویه اشریشیاکلی ATCC ۲۵۹۲۲ به عنوان کنترل منفی و از سویه کلبسیلا پنومونیه ATCC ۷۰۰۶۰۳ به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. بر طبق دستور العمل فوق الذکر نمونه های دارای ESBLs برای انجام آزمون مولکولی PCR شناسایی می شوند [۱۷۵ و ۱۴۷].

جدول ۳-۳ تست تاییدی فنوتیپی دیسک ترکیبی ESBLs [۱۷۵ و ۱۴۷].

Test	Initial Screen Test		Phenotypic Confirmatory Test	
Test Method	Disk diffusion	Broth microdilution	Disk diffusion	Broth microdilution
Results	<p>For <i>K. pneumoniae</i>, <i>K. oxytoca</i>, and <i>E. coli</i>:</p> <p>Cefpodoxime zone ≤ 17 mm</p> <p>Ceftazidime zone ≤ 22 mm</p> <p>Aztreonam zone ≤ 27 mm</p> <p>Cefotaxime zone ≤ 27 mm</p> <p>Ceftriaxone zone ≤ 25 mm</p> <p>For <i>P. mirabilis</i>:</p> <p>Cefpodoxime zone ≤ 22 mm</p> <p>Ceftazidime zone ≤ 22 mm</p> <p>Cefotaxime zone ≤ 27 mm</p> <p>Zones above may indicate ESBL production.</p>	<p>Growth at or above the screening concentrations may indicate ESBL production (ie, for <i>E. coli</i>, <i>K. pneumoniae</i>, and <i>K. oxytoca</i>, MIC ≥ 8 $\mu\text{g/mL}$ for cefpodoxime or MIC ≥ 2 $\mu\text{g/mL}$ for ceftazidime, aztreonam, cefotaxime, or ceftriaxone; and for <i>P. mirabilis</i>, MIC ≥ 2 $\mu\text{g/mL}$ for cefpodoxime, ceftazidime, or cefotaxime).</p>	<p>A ≥ 5-mm increase in a zone diameter for either antimicrobial agent tested in combination with clavulanic acid vs the zone diameter of the agent when tested alone = ESBL (eg, ceftazidime zone = 18; ceftazidime-clavulanic acid zone = 21).</p>	<p>A ≥ 3 twofold concentration decrease in an MIC for either antimicrobial agent tested in combination with clavulanic acid vs the MIC of the agent when tested alone = ESBL (eg, ceftazidime MIC = 8 $\mu\text{g/mL}$; ceftazidime-clavulanic acid MIC = 1 $\mu\text{g/mL}$).</p>
Reporting			<p>For all confirmed ESBL-producing strains:</p> <p>If laboratories do not use current cephalosporin and aztreonam interpretive criteria, the test interpretation should be reported as resistant for all penicillins, cephalosporins, and aztreonam.</p> <p>If laboratories use current cephalosporin and aztreonam interpretive criteria, then test interpretations for these agents do not need to be changed from susceptible to resistant.</p>	

۳-۶-۳ تست تاییدی فنوتیپی دیسک ترکیبی ESBLs در محیط مولر هیتون آگار (MHA) حاوی

کلوگزاسیلین

تمامی ایزوله هایی که دارای تست غربالگری مثبت بوده برای تعیین جلوگیری از اثر هم پوشانی AmpC بتالاکتامازها، بار دیگر در محیط MHA حاوی کلوگزاسیلین (۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر، سیگما) مورد بررسی قرار گرفتند، به دلیل اینکه AmpC بتالاکتامازها نیز می توانند سبب بروز مقاومت به سفالوسپورین ها شوند و به کلونیک اسید نیز مقاوم می باشد [۲۳۴].



FIG. 1. *E. coli* that produces an ESBL and a high level of AmpC. Shown is a CLSI ESBL confirmatory test on Mueller-Hinton agar supplemented with 200 µg/ml cloxacillin. No inhibition zones were obtained on unsupplemented Mueller-Hinton agar. The disks, from left to right, are as follows: upper, ceftazidime-clavulanate and ceftazidime; lower, cefotaxime-clavulanate and cefotaxime.

شکل ۳-۲ تست تاییدی فنوتیپی دیسک ترکیبی ESBLs با استفاده از محیط مولر هیتون آگار

(MHA) حاوی کلوگزاسیلین [۲۳۴].

۳-۷ انجام آزمون واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) جهت شناسایی ژن های مولد ESBLs *bla*

bla SHV و *bla* TEM و CTX-M-1

جدول ۳-۴. لیست پرایمرهای جهت بررسی بیان ژن های *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{TEM} و *bla*_{SHV}

ژن	(bp)سایز	توالی پرایمر	رفرانس
<i>SHV</i>	865	F 5'-GGTTATGCGTTATATTCGCC-3' R 5'-TTAGCGTTGCCAGTGCTC-3'	۲۳۵
<i>TEM</i>	1080	F 5'-ATGAGTATTCAACATTTCCG -3' R 5'-CTGACAGTTACCAATGCTTA -3'	۲۳۵
<i>CTX-M-1</i>	864	F 5'-ATGGTTAAAAAATCACTGCGTC-3' R 5'-TTGGTGACGATTTTAGCCGC -3'	۲۳۶

۳-۷-۱ استخراج DNA

✓ مواد اولیه مورد نیاز جهت استخراج

- بن ماری ۱۰۰ درجه سانتی گراد
- میکروتیوب ۱/۵
- آب مقطر استریل
- میکروسانتریفیوژ
- انکوباتور ۳۷ درجه
- سمپلر و سر سمپلر استریل
- فیلدوپلاتین
- دستکش ، مازیک و ماسک
- شیکر
- نانودراپ
- رک میکروتیوب ۱/۵

✓ مراحل استخراج DNA با استفاده از روش Boilling صورت می گیرد:

۱- برای استخراج DNA به روش Boilling نیاز به کلونی از کشت تازه ۲۴ ساعته داریم، به این منظور نمونه هایی که در ازمون فنو تیپی از نظر تولید بتالاکتامازهای گسترش یافته مثبت شدند برای استخراج DNA کشت داده شدند، بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد و رشد سویه های مورد نظر آماده استخراج می باشد.

۲- ابتدا ۳ تا ۵ کلونی از هر نمونه را داخل ویال اپندورف ۱/۵ میلی متر حاوی ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل شدند.

۳- با استفاده از شیکر آن قدر نمونه ها را Shake می کنیم تا اینکه کاملاً حل شوند.

۴- ویال ها را به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه، داخل بن ماری جوش (۱۰۰ درجه سانتیگراد)، قرار دادیم به طوری که سطح آب جوش دو سوم ویال اپندورف ۱/۵ میلی متر را در بر گیرد.

۵- سپس ویال ها را به مدت ۱۰-۵ دقیقه، با دور ۱۴۰۰۰ با استفاده از اولترا سانیتریفورژ شدند.

۶- محلول رویی ویال های اپندورف که حاوی DNA می باشد، برای انجام واکنش PCR به اپندورف استریل منتقل شد.

✓ ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده

برای ارزیابی کیفیت DNA مقدار ۱ میکرولیتر از DNA نمونه استخراج شده را در دستگاه نانودراپ قرار داده و غلظت DNA به طور دقیق بر حسب نانوگرم تعیین گردید . سپس مقدار پرتو ماوراء بنفش جذب شده به وسیله DNA در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه گیری شد و مقادیر جذب نوری تعیین گردید. در یک نمونه خالص DNA نسبت جذب ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر (A260/ A280) برابر ۱/۸ می -

باشد. لذا نسبت‌های کمتر از ۱/۸ بیانگر این بود که نمونه استخراج شده از لحاظ پروتئین و غیره ناخالصی دارد. بنابراین نمونه‌ای که مراحل استخراج آن مناسب انجام شده باشد، OD بین ۱/۸ تا ۲ دارد. استخراج به این روش به صورت روزانه انجام گرفت و برای حصول به نتایج بهتر در PCR، DNA استخراج شده نگهداری نمی‌شد.

۳-۷-۲ انجام آزمون PCR

۱- پرایمر

پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه نیز برگرفته از پرایمرهای مورد استفاده در مطالعات قبلی می‌باشد [۲۳۵-۲۳۶].

۲- ولیکن به جهت اطمینان از اتصال اختصاصی این پرایمرها از برنامه BLAST در بانک ژنی NCBI^{۲۵۳} استفاده گردید. پس از حصول اطمینان از توالی‌های مورد نظر، سنتز پرایمرهای انتخابی توسط شرکت Macrogen - Korea صورت پذیرفت. توالی نوکلئوتیدی و مشخصات جفت پرایمرهای مورد استفاده برای PCR در (جدول ۳-۴) آمده است.

۳- پس از دریافت پرایمرها به صورت لیوفیلیزه از شرکت، مطابق برگه دستورالعمل پرایمر اقدام به تهیه یک محلول ذخیره برای هر یک از پرایمرهای Forward و Reverse شد.

۴- بدین ترتیب غلظت نهایی هر یک از پرایمرها $100 \mu\text{mol}$ می‌گردد. سپس هر یک از پرایمرها تا زمان مصرف در فریزر -20°C قرار داده می‌شوند و برای تهیه محلول کار و مستر میکس محلول پرایمر با غلظت $10 \mu\text{mol}$ تهیه می‌گردد و برای هر واکنش PCR از این محلول کار، استفاده می‌گردد.

✓ مواد و وسایل موردنیاز

- ست سمپلر و سر سمپلر آبی، زرد، کریستالی استریل
- میکروتیوب ($200\mu\text{l}$ - $500\mu\text{l}$ و $1500\mu\text{l}$)
- دستگاه ترموسایکلر
- ظرف یخ (تمام مراحل تهیه سوسپانسیون اصلی و افزودن DNA الگو و آنزیم Taq DNA Polymerase باید بر روی یخ انجام گیرد.) و آب مقطر دیونیزه
- سویه‌های کنترل مثبت
- پرایمرهای اختصاصی Forward , Reverse با غلظت ۱۰ میکرومول
- Mastermix
- ✓ آماده سازی واکنش PCR:

در این مرحله ابتدا Mastermix تهیه شد (جدول ۳-۵). برای بدست آوردن بهترین مقدار ترکیبات مورد استفاده، گرادیانی از مقادیر مختلف این ترکیبات تهیه شد و طی چند واکنش مختلف PCR بهینه سازی انجام شد (مواد لازم جهت ساخت Mastermix از شرکت ژن فن آوران ایران تهیه شد).

جدول ۳-۵. مقادیر بهینه برای تهیه Mastermix یک واکنش PCR

ترکیب	حجم (میکرولیتر)
DNTP mix 10 mol	2
PCR Buffer 10X	10
Mgcl ₂ 50 mmol	3
D.H ₂ O	73
Total Volum Mastermix	88

با در نظر گرفتن اینکه در این مطالعه حجم نهایی هر واکنش PCR، ۲۵ میکرولیتر است، حجم پرایمرها، DNA الگو و میزان آنزیم پلیمرز که به Mastermix اضافه می شوند، در جدول ۳-۶ آمده است.

جدول ۳-۶. مواد ملکولی مورد نیاز جهت انجام یک واکنش PCR

ترکیب	حجم (میکرولیتر)
Mastermix	21.75
DNA Template	1
Primer F	1
Primer R	1
Tag pol 5u/l	0.25
Total volum	25

✓ برنامه ریزی دستگاه ترموسایکلر ساخت کشور امریکا (Applied biosystems Thermocycler)

پس از آماده سازی مواد هر یک از ویال ها در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفتند. شرایط دمایی مختلف و زمان های هر سیکل برای هر یک از ژن ها در جدول (۳-۷) ذکر شده است.

جدول ۳-۷. شرایط برنامه ریزی دستگاه ترموسایکلر برای واکنش PCR برای ژنوتیپ های مورد نظر

ژن	initial denaturation	denaturation	annealing	extension	final extension
<i>bla_{TEM}</i>	96°C for 5min	96°C for 1min	50°C for 1min	72°C for 1min	72°C for 10min
<i>bla_{SHV}</i>	96°C for 5min	96°C for 1min	55°C for 1min	72°C for 1min	72°C for 10min
<i>bla_{CTX-M-1}</i>	96°C for 5min	96°C for 1min	53°C for 1min	72°C for 1min	72°C for 10min



شکل ۳-۳ دستگاه ترموسایکلر Applied biosystems (ساخت کشور آمریکا) استفاده شده در مطالعه

حاضر

۳-۷-۳ الکتروفورز

الکتروفورز محصولات PCR، با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ ارزیابی گردید.

مواد و وسائل مورد نیاز

- پودر آگارز^{۲۵۴}
- 10 X TBE buffer^{۲۵۵} (ضمیمه)
- 1 X TBE buffer (ضمیمه)
- اتیدیوم بروماید
- Loading Buffer (Fermentase)
- Marker (Ladder) (Fermentase)

^{۲۵۴} Agarose
^{۲۵۵} Tris-HCl Boric Acid EDTA

■ تانک الکتروفورز^{۲۵۶}

■ منبع تغذیه الکتریکی^{۲۵۷}

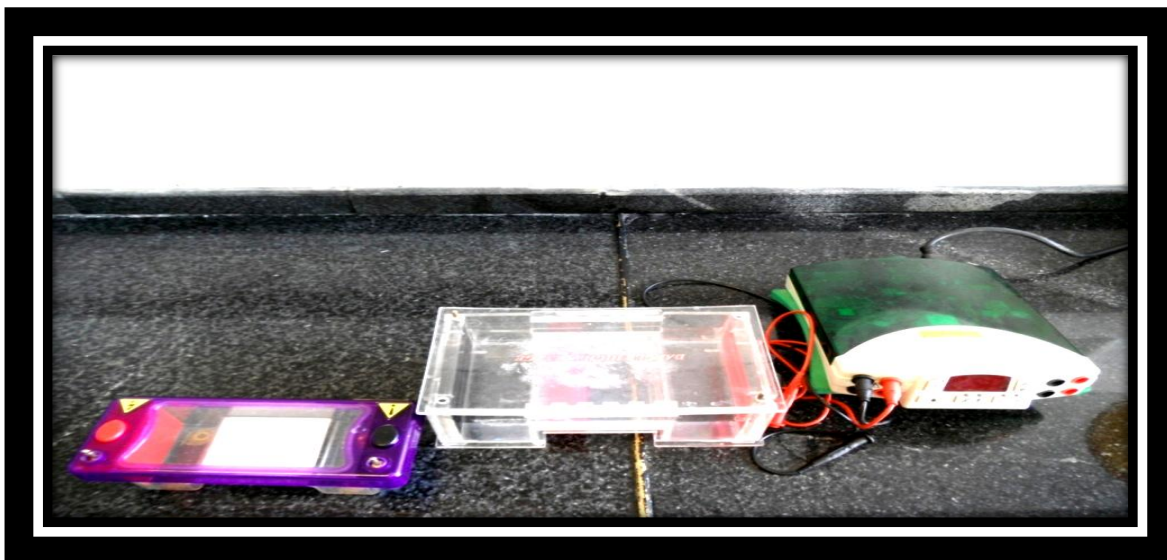
■ سمپلر و سرسمپلر^{۲۵۸}

■ سینی ژل^{۲۵۹}

■ شانه ژل^{۲۶۰}

در این مطالعه با توجه به وزن ژنهای مورد نظر، ژل ۱٪ تهیه شد. برای تهیه ژل ۱٪ در قالب کوچک، ۱/۳ گرم پودر آگارز در ۱۳۰ میلی لیتر TBE buffer 1 X حل کرده و آن را می جوشانیم تا کاملاً آگارز در داخل بافر حل شود و محلول شفاف گردد. پس از رسیدن دمای محلول آگارز ساخته شده به حدود ۴۵ تا ۵۰ درجه به ازای هر ۱۰ میلی لیتر ژل، یک میکرولیتر محلول اتیدیوم بروماید اضافه شده و در نهایت ژل داخل قالب ریخته می شود. بعد از بستن کامل ژل ابتدا شانه رادرآورده و ژل در داخل تانک الکتروفورز قرار می گیرد. داخل تانک به حدی بافر TBE می ریزیم که روی ژل را کاملاً بپوشاند. ۵ میکرولیتر از محصول PCR را با یک میکرولیتر بافر سنگین کننده Loading buffer 6x کاملاً مخلوط کرده و سپس به آرامی داخل چاهکها قرار می گیرد. از آنجایی که DNA شارژ منفی دارد، به همین علت برای الکتروفورز شدن باید نمونه ها به طرف قطبی منفی باشد تا موقع الکتروفورز به سمت قطب مثبت حرکت کند. تانک الکتروفورز به منبع برق وصل شده و ولتاژ تنظیم شده (۷۰-۸۰V) و الکتروفورز شروع می شود. وقتی نمونه ۷۵٪ طول ژل را طی کرد، ژل را از تانک خارج کرده در دستگاه ژل داک قرار می دهیم و در نور فرابنفش (UV 25 μm) باندهای ایجاد شده را با دستگاه ترانس لومیناتور مشاهده و بررسی می کنیم و از جهت

بایگانی، تصویر برداری و ذخیره سازی انجام می گیرد. می توان عکس ژل را توسط دستگاه ژل داک تهیه کرد.



شکل ۳-۴. تانک الکتروفورز، منبع تغذیه مورد استفاده در مطالعه حاضر



شکل ۳-۵. دستگاه Gel-Documentation مورد استفاده در مطالعه حاضر

۸-۳ تعیین توالی محصولات PCR (Sequencing)

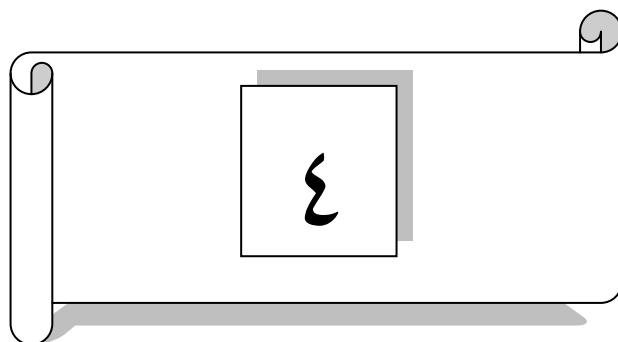
محصول PCR هر یک از ژن ها جداگانه از نظر تائید حضور ژن توسط شرکت ژن فن آوران به شرکت Macrogene (کره جنوبی) ارسال شد. پس از دریافت نتایج توالی ها با نرم افزار chromas بررسی و سپس جهت آنالیز ابتدا در NCBI، blast شده و با ژن های سویه های استاندارد ثبت شده در این بانک ژنی alignment انجام شد.

✓ کنترل کیفی آزمایش PCR:

برای اطمینان از صحت آزمایش، از سویه استاندارد اشریشیاکلی ATCC ۲۵۹۲۲ به عنوان کنترل منفی و از سویه کلبسیلا پنومونیه ATCC ۷۰۰۶۰۳ به عنوان کنترل مثبت ژن SHV و از سویه استاندارد اشریشیاکلی ATCC ۳۵۲۱۸ به عنوان کنترل مثبت ژن TEM استفاده شد. از ایزوله های سفارش و تایید شده کد کننده ژن CTX-M-1 دریافت شده از خانم دکتر شاهچراغی انیستوپاستور به عنوان کنترل مثبت استفاده شدند. برای کنترل انجام آزمون از میکروتیوپ های حاوی مواد واکنش بدون DNA الگو استفاده شد.

۹-۳ روش جمع آوری و تجزیه و تحلیل داده ها:

پس از جمع آوری داده ها یافته ها در قالب جداول فراوانی نمودار شاخص های عددی ارائه گردید برای تحلیل داده ها از آزمون مجذور کای و تست دقیق فیشر استفاده شد. داده ها به وسیله نرم افزار SPSS ویرایش ۱۶ تجزیه و تحلیل شد. مقدار P valu کمتر از 0.05 از لحاظ آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

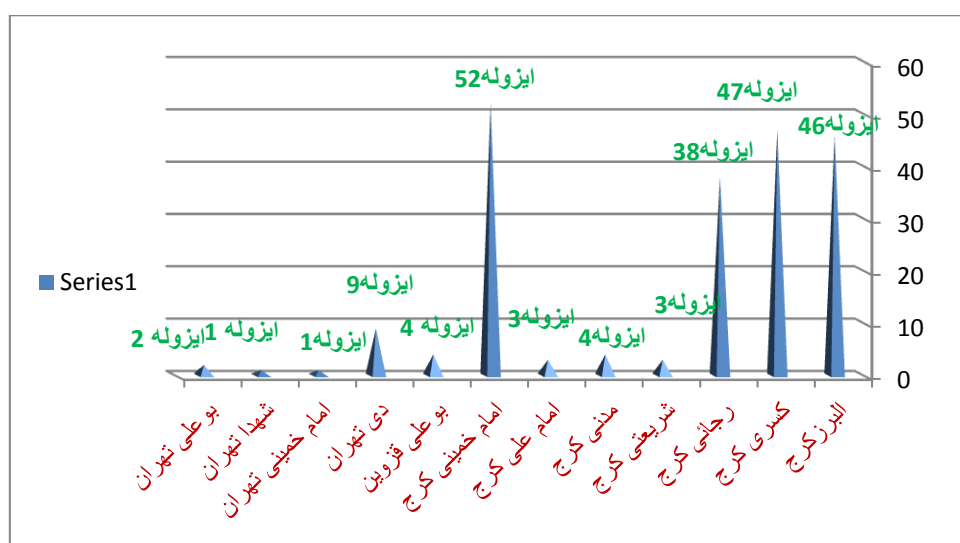


بخش چهارم

یافته ها

۴-۱ ایزوله های اشریشیاکلی به تفکیک شهر

تعداد ۲۱۰ ایزوله اشریشیاکلی، در یک پریود زمانی یکساله، از فروردین سال ۱۳۹۲ تا فروردین ۱۳۹۳، از نمونه های ادرار از بیماران بستری در بخش های مراقبت ویژه در بیمارستان های شهرهای تهران (دی، امام خمینی، شهدا، بوعلی)، قزوین (بوعلی) و کرج (البرز، امام خمینی کرج، کسری، رجایی، مدنی، شریعتی) جمع آوری شدند (نمودار ۴-۱). در مجموع از ۲۱۰ ایزوله، ۱۵۲ (۷۲/۴٪) ایزوله از بیماران زن و ۵۸ (۲۷/۶٪) ایزوله از بیماران مرد جداسازی شده اند (جدول ۴-۱). میانگین سنی بیماران ۱۷ تا ۸۵ سال با معدل میانگین سنی $(49 \pm 17/8)$. نمونه ها مجددا در آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین توسط آزمون های استاندارد میکروب شناسی تایید شدند. ایزوله های برای بررسی تولید بتالاکتامازهای با طیف گسترده ESBLs ابتدا با استفاده از دیسک های سفوتاکسیم، سفتازیدیم، سفتریاکسون، سفپودوکسیم و آزترونام غربالگری شده و سپس به روش دیسک ترکیبی (دیسک سفتازیدیم-کلاولانیک اسید و دیسک سفوتاکسیم-کلاولانیک اسید) بر روی محیط مولر هیتون آگار بدون کلوگراسیلین و با کلوگراسیلین مورد تایید قرار گرفتند.



نمودار ۴-۱ توزیع فراوانی نسبی ایزوله های جمع آوری شده بر اساس بیمارستان

جدول ۴-۱ فراوانی ایزوله های اشریشیاکلی جدا شده بر اساس جنسیت



۴-۲ نتایج تست حساسیت آنتی بیوتیکی اشریشیاکلی جدا شده از بیماران بستری شده در بخش های

مراقبت و ویژه به روش دیسک دیفیوژن آگار :

حساسیت آنتی بیوتیکی سویه های جدا شده از بیماران در جدول (۴-۳) و در نمودار (۴-۲) نشان داده شده

است. که بالاترین درصد مقاومت اشریشیاکلی به ترتیب نسبت به آنتی بیوتیک های سفپودوکسیم $30\mu\text{g}$

(۱۶۱) $76/7\%$ ، سفوتاکسیم $30\mu\text{g}$ (۱۵۴) $73/3\%$ ، سفتریاکسون $30\mu\text{g}$ (۱۵۲) $72/4\%$ ، سفتازیدیم

$30\mu\text{g}$ (۱۱۴) $54/3\%$ ، سفپیم $30\mu\text{g}$ (۱۱۲) $53/3\%$ ، ایمپینم $10\mu\text{g}$ (۱۱۰) $52/4\%$ ، ازترون نام $10\mu\text{g}$

(۱۰۵) 50% و سفوکسیتین $30\mu\text{g}$ (۴۵) $21/4\%$ مشاهده شد جدول (۴-۲).

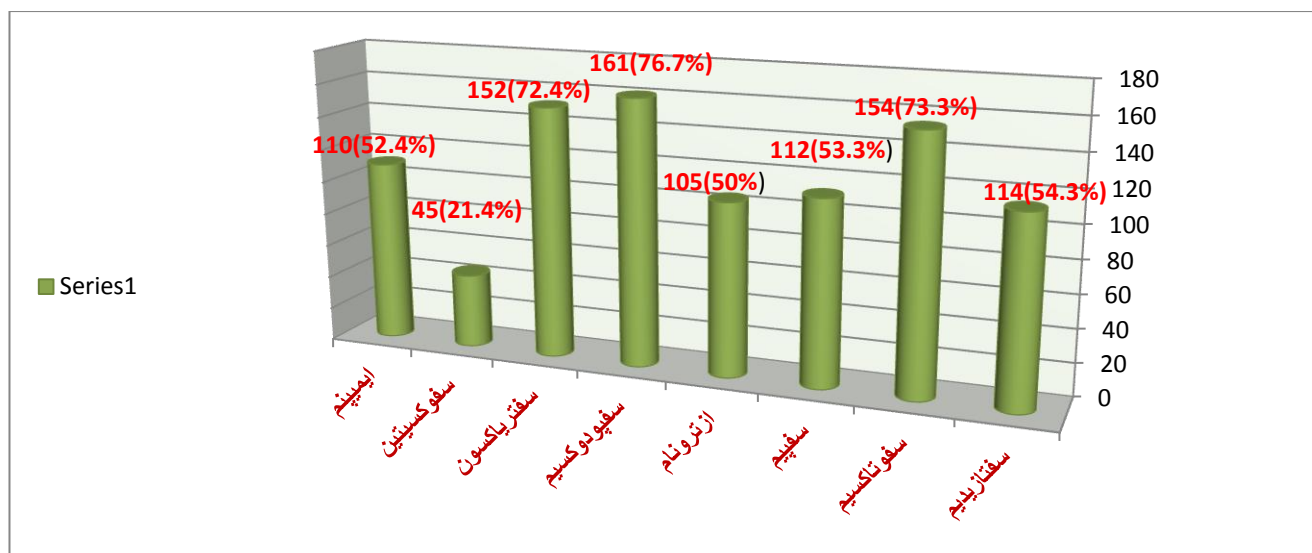
جدول ۴-۲ میزان مقاومت ایزوله ها به آنتی بیوتیک ها

آنتی بیوتیک	تعداد ایزوله های مقاوم	درصد
سفپودوکسیم	۱۶۱	$76/7\%$
سفوتاکسیم	۱۵۴	$73/3\%$
سفتریاکسون	۱۵۲	$72/4\%$
ایمپینم	۱۱۰	$52/4\%$
ازترون نام	۱۰۵	50%
سفوکسیتین	۴۵	$21/4\%$

حساسیت آنتی بیوتیکی اشريشياکلی به آنتی بیوتیک های سفوکسیتین ۳۰μg (۱۲۴)٪، ایمپنم ۱۰μg (۱۰۰)٪، سفپیم ۳۰μg (۸۹)٪، ازترونام ۱۰μg (۸۷)٪، سفنازیدیم ۳۰μg (۸۰)٪، سفتریاکسون ۳۰μg (۵۳)٪، سفوتاکسیم ۳۰μg (۵۲)٪ و سفودوکسیم ۳۰μg (۴۷)٪. مشاهده شد (جدول ۴-۳).

جدول ۴-۳ نتایج تست حساسیت آنتی بیوتیکی در اشريشياکلی جدا شده از بیماران ICU

آنتی بیوتیک	مقاوم	نیمه حساس	حساس
سفنازیدیم	۵۴/۳ (۱۱۴)٪	۷/۶ (۱۶)٪	۳۸/۱ (۸۰)٪
سفوتاکسیم	۷۳/۳ (۱۵۴)٪	۱/۹ (۴)٪	۲۴/۸ (۵۲)٪
سفپیم	۵۳/۳ (۱۱۲)٪	۴/۳ (۹)٪	۴۲/۴ (۸۹)٪
ازترونام	۵۰ (۱۰۵)٪	۸/۶ (۱۸)٪	۴۱/۴ (۸۷)٪
سفودوکسیم	۷۶/۷ (۱۶۱)٪	۱ (۲)٪	۲۲/۴ (۴۷)٪
سفتریاکسون	۷۲/۴ (۱۵۲)٪	۲/۴ (۵)٪	۲۵/۲ (۵۳)٪
سفوکسیتین	۲۱/۴ (۴۵)٪	۱۹/۵ (۴۱)٪	۵۹ (۱۲۴)٪
ایمپنم	۵۲/۴ (۱۱۰)٪	۰٪	۴۷/۶ (۱۰۰)٪



نمودار ۴-۲ درصد مقاومت آنتی بیوتیکی اشریشیا کلی جدا شده از بیماران ICU

۴-۳ نتایج غربالگری ESBLs :

از ۲۱۰ نمونه جمع آوری شده، ۱۵۹ (۷۵/۷٪) ایزوله نسبت به سفوتاکسیم، ۱۴۲ (۶۷/۶٪) ایزوله نسبت به سفتازیدیم، ۱۶۳ (۷۷/۶٪) ایزوله نسبت به سفپودوکسیم، ۱۲۳ (۵۸/۶٪) ایزوله نسبت به آزترونام و ۱۵۸ (۷۵/۲٪) ایزوله نسبت به سفتریاکسون دارای غربالگری مثبت بودند. در مجموع ۱۶۶ (۷۹٪) ایزوله در این مرحله از نظر غربالگری ESBLs مثبت و ۴۴ (۲۱٪) ایزوله از نظر غربالگری ESBLs منفی شدند. موارد مثبت، برای تایید حضور بتا لاکتامازهای ESBLs، جهت انجام تست تاییدی دیسک ترکیبی انتخاب شدند (شکل ۴-۱).

جدول ۴-۴ نتایج مرحله غربالگری شناسایی ESBLs در ایزوله های اشریشیاکلی

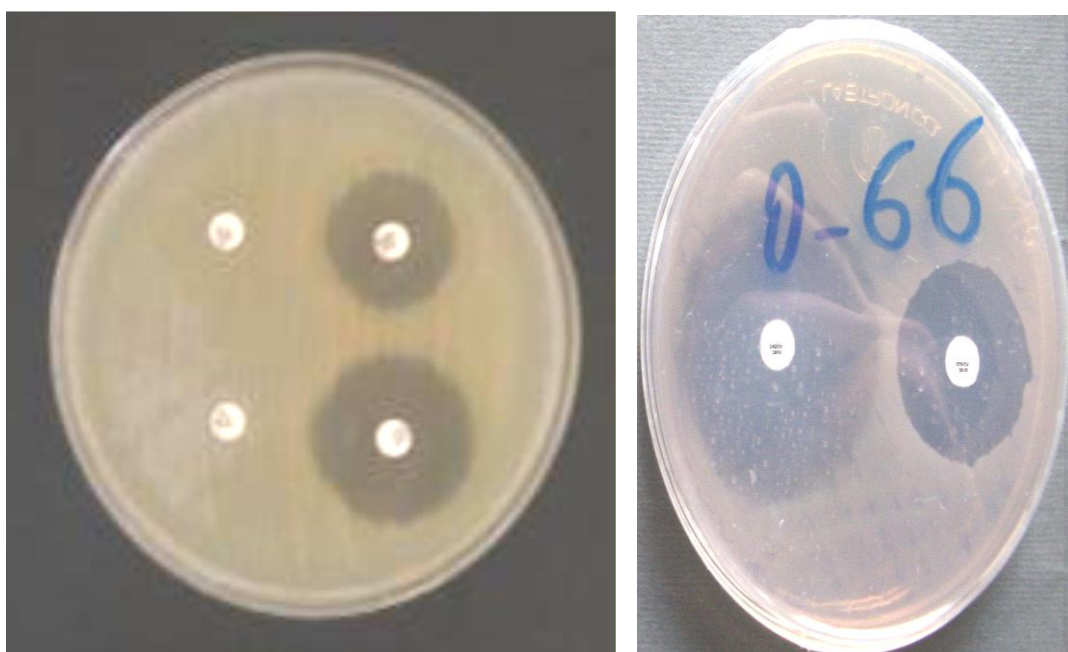
آنتی بیوتیک	تعداد ایزوله های مقاوم	درصد. %
سفتازیدیم	۱۴۲	۶۷/۶
سفتو تاکسیم	۱۵۹	۷۵/۷
ازترونام	۱۲۳	۵۸/۶
سفتودوکسیم	۱۶۳	۷۷/۶
سفتریاکسون	۱۵۸	۷۵/۲

جدول ۴-۵ مقایسه نتایج همزمان آنتی بیوتیک های مورد استفاده در غربالگری ESBLs

موارد مثبت غربالگری	درصد
به هیچ آنتی بیوتیک	۲۰/۵
به یک آنتی بیوتیک	۲/۹
همزمان به دو تا آنتی بیوتیک	۱/۹
همزمان به سه تا آنتی بیوتیک	۶/۲
همزمان به چهار تا آنتی بیوتیک	۱۳/۳
همزمان به پنج تا آنتی بیوتیک	۵۵/۲

۴-۴ نتایج تست تاییدی ESBLs:

در این مرحله از ۱۶۶ (۷۹٪) ایزوله مرحله غربالگری، ۱۶۱ (۷۶/۷٪) ایزوله از نظر حضور بتالاکتامازهای طیف گسترده تایید شدند. قطر هاله عدم رشد هر یک از دیسک های آنتی بیوتیکی این ایزوله ها در مقایسه با قطر هاله عدم رشد دیسک های ترکیبی حاوی آنتی بیوتیک و کلاولانیک اسید به میزان ۵ میلی متر یا بیشتر افزایش نشان دادند و به عنوان ایزوله های مولد ESBLs در نظر گرفته شدند (شکل ۴-۱).

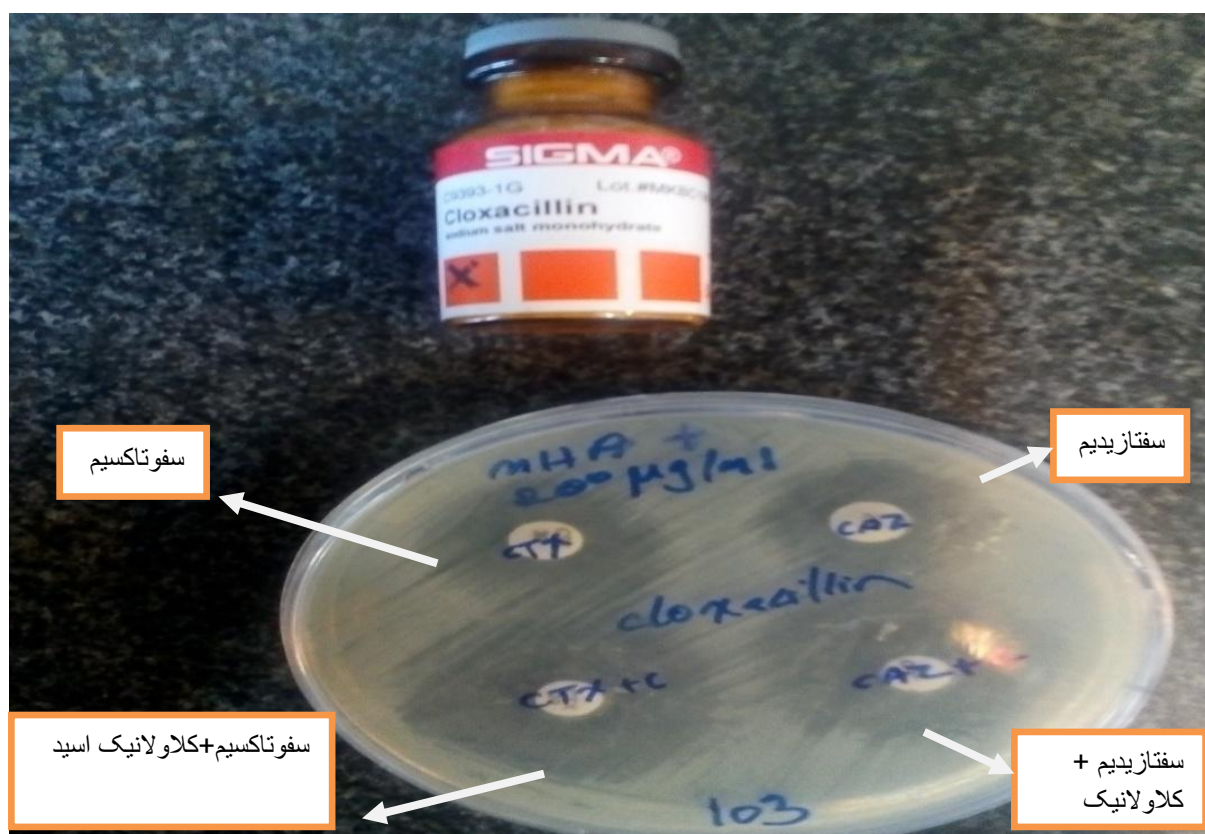


شکل ۴-۱. تست فنوتیپی تاییدی ESBLs بر روی ایزوله های اشریشیا کلی

۴-۵ نتایج تست تاییدی فنوتیپی دیسک ترکیبی ESBLs در محیط مولر هیتون آگار (MHA)

حاوی کلوزاسیلین

از ۱۶۶ ایزوله ای که دارای تست غربالگری مثبت بوده برای تعیین جلوگیری از اثر هم پوشانی AmpC بتالاتاماز ها ، بار دیگر در محیط MHA حاوی کلوزاسیلین (۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر، سیگما) مورد بررسی قرار گرفتند و ۴ (۲/۵٪) از ایزوله هایی که دارای تست غربالگری مثبت بودند، تنها با روش دیسک ترکیبی در محیط مولر هیتون آگار (MHA) حاوی کلوزاسیلین مثبت شدند.



شکل ۴-۲ تست تاییدی فنوتیپی دیسک ترکیبی ESBLs با استفاده از محیط مولر هیتون آگار

(MHA) حاوی کلوزاسیلین

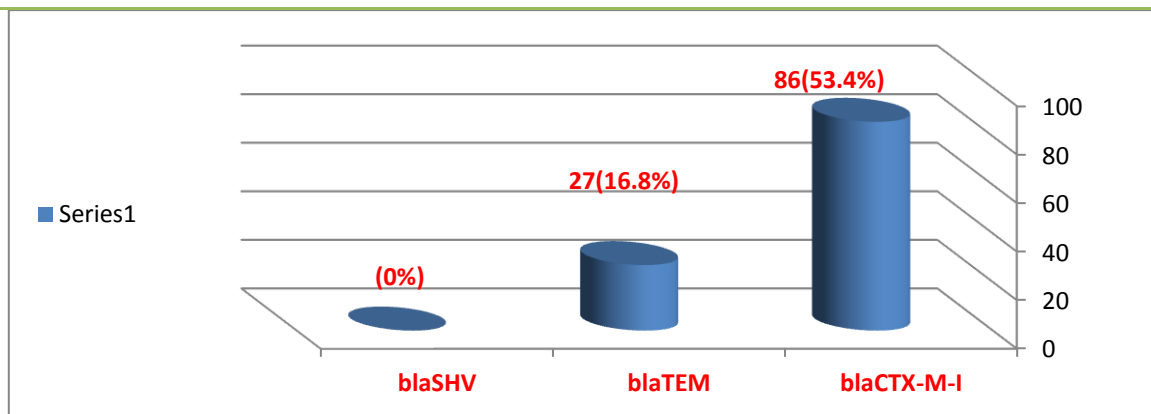
۶-۴ نتایج ژنوتیپی فراوانی بتالاكتامازها:

با انجام آزمون PCR بر روی ایزوله های مولد بتالاكتامازها فراوانی ژن های $bla_{CTX-M-I}$ ، bla_{TEM} و bla_{SHV} سنجیده شد. همانطور که در جدول (۶-۴) آمده است از بین ژن های مولد ESBLs جداسازی شده در این مطالعه $bla_{CTX-M-I}$ فراوانترین بودند.

جدول ۶-۴ فراوانی ژن های bla_{TEM} ، $bla_{CTX-M-I}$ و bla_{SHV} در ۱۶۱ ایزوله اشريشيا کلي مولد

ESBL تایید شده با روش های فنوتیپی

positive ESBL	ژن
۷۰ (۴۳/۵٪)	$bla_{CTX-M-I}$
۱۱ (۶/۸٪)	bla_{TEM}
۱۶ (۱۰٪)	$bla_{TEM} + bla_{CTX-M-I}$
۰ (۰٪)	bla_{SHV}
۶۴ (۳۹/۸٪)	سایر ژن های ESBLs
۱۶۱ (۱۰۰٪)	Total

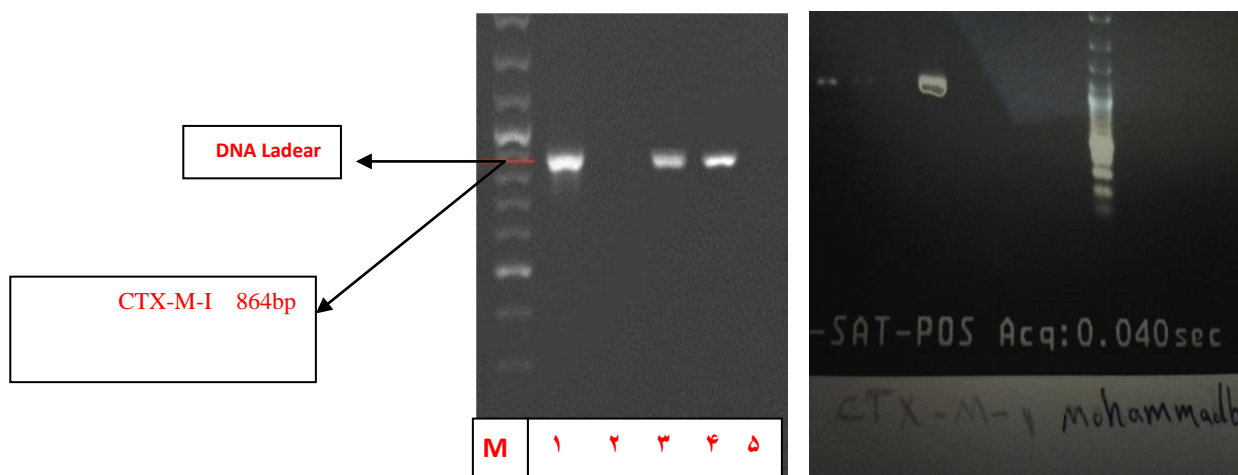


نمودار ۳-۴ فراوانی ژن های *bla*_{TEM} ، *bla*_{CTX-M-I} و *bla*_{SHV} در ایزوله های اشیریشیا کلی

شناسایی ژن های *bla*_{TEM} ، *bla*_{CTX-M-I} و *bla*_{SHV} در سویه های غربالگری اولیه ESBLs با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و با روش PCR انجام شد.

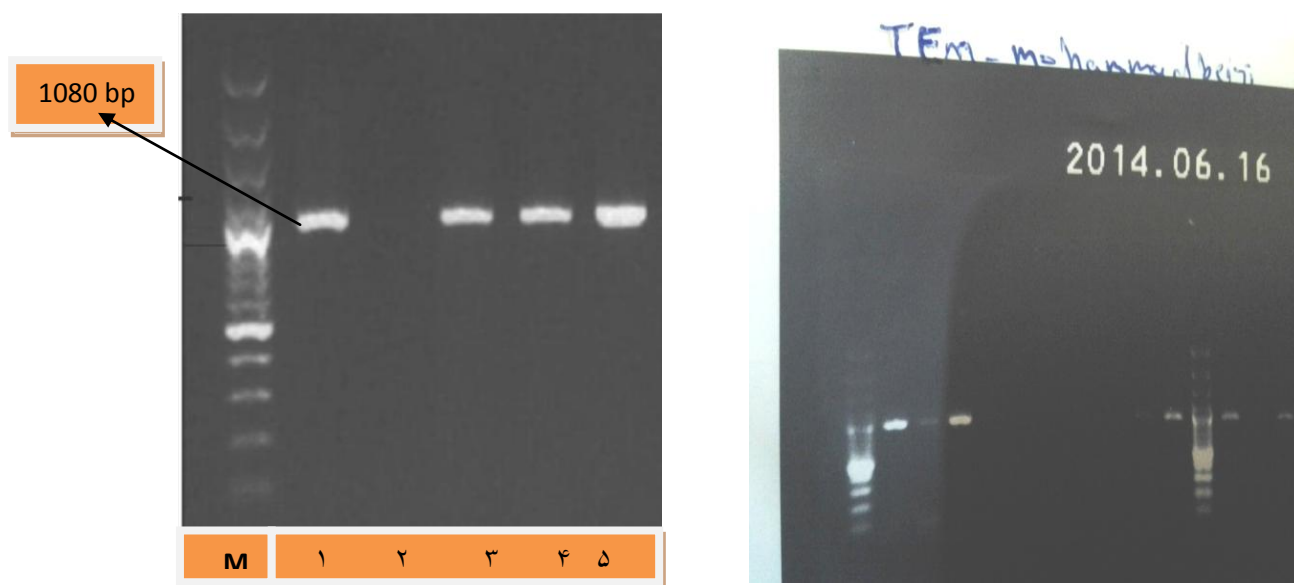
از ۱۶۱ (۷۶/۷ درصد) ایزوله ESBLs مثبت ۸۶ (۵۳/۴ درصد) ایزوله حامل ژن *bla*_{CTX-M-I}، ایزوله های مولد *bla*_{CTX-M-I} از نوع (۹۶/۵٪ *bla*_{CTX-M-15} و ۳/۵٪ *bla*_{CTX-M-12} به عنوان اولین گزارش از ایران) می باشند.

۲۷ (۱۶/۸ درصد) ایزوله از ۱۶۱ (۷۶/۷ درصد) ایزوله ESBLs مثبت حامل ژن *bla*_{TEM} و هیچ ایزوله که حامل ژن *bla*_{SHV} یافت نشد.



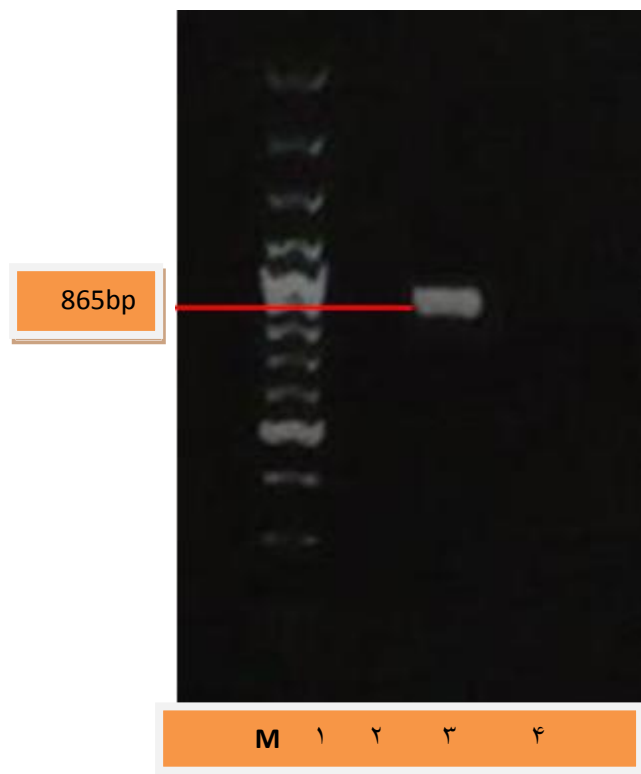
شکل ۳-۴ محصول PCR ژن $bla_{CTX-M-I}$: M : DNA مارکر، ۱: کنترل مثبت ۲: کنترل منفی ۳-۴:

ایزوله های بالینی مولد ژن $bla_{CTX-M-I}$ ، ۵: ایزوله بدون ژن $bla_{CTX-M-I}$



شکل ۴-۴ محصول PCR ژن bla_{TEM} : M : DNA مارکر، ۱: کنترل مثبت ۲: کنترل منفی ۳-۵: ایزوله

های بالینی مولد ژن bla_{TEM}



شکل ۴-۵ محصول PCR ژن *bla*_{SHV}; M: DNA مارکر، ۱: کنترل منفی ۲: کنترل مثبت ۳-۴: ایزوله

های بالینی بدون ژن *bla*_{SHV}

جدول ۴-۷ توزیع فراوانی مقاومت های آنتی بیوتیکی بر حسب ژن های $bla_{CTX-M-I}$ (Total=86) و bla_{TEM} (Total=27)

R: Resistant, I:Intermediate, S:Sensitive,
Ceftazidime(CAZ),Cefotaxime(CTX),Ceftriaxone(CRO), Cefpodoxime(CPD),
Cefepime(FEP),Imipenem(IMP), Cefoxitin(FOX) ,Aztreonam(ATM)

	CTX			CAZ			ATM			CPD			FEP			CRO			FOX			IMP		
	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S
$bla_{CTX-M-I}$	84	0	2	58	9	19	57	12	17	83	2	1	63	4	19	82	2	2	16	21	49	57	0	29
%	97.7	0	2.3	67.4	10.5	22.1	66.3	13.9	19.7	96.5	2.3	1.1	73.3	4.6	22.1	95.3	2.3	2.3	18.6	24.4	56.9	66.3	0	33.8
bla_{TEM}	26	0	1	18	3	6	16	1	10	27	0	0	17	2	8	27	0	0	8	7	12	18	0	9
%	96.3	0	3.7	66.6	11.1	22.2	59.3	3.7	37	100	0	0	62.9	7.4	29.6	100	0	0	29.6	25.9	44.4	66.7	0	3.3

جدول ۴-۸ توزیع فراوانی بر حسب ژن های $bla_{CTX-M-I}$ (Total=86) و bla_{TEM} (Total=27) و Total: 210
Number:N_{TEM} (تعداد ایزوله ها در بیمارستان های مختلف) و

	1(N=46)	2(N=42)	3(N=2)	4(N=1)	5(N=1)	6(N=4)	7(N=52)	8(N=9)	9(N=4)	10(N=38)	11(N=3)	12(N=3)
$bla_{CTX-M-I}$	19(41.3%)	13(27.65%)	1(50%)	0%	0%	3(75%)	24(46.1%)	6(66.6%)	1(25%)	16(42.1%)	1(33.3%)	2(66.6%)
bla_{TEM}	6(13%)	9(19.2%)	1(50%)	0%	0%	1(25%)	3(5.8%)	1(11.1%)	1(25%)	4(10.5%)	0%	1(33.3%)

۷-۴ نتایج تعیین توالی

از ۱۶۱ (۷۶/۷ درصد) ایزوله ESBLs مثبت ۸۶ (۵۳/۴ درصد) ایزوله حامل ژن *bla*_{CTX-M-I}، ایزوله های مولد *bla*_{CTX-M-I} از نوع (۹۶/۵٪ *bla*_{CTX-M-15} و ۳/۵٪ *bla*_{CTX-M-12} به عنوان اولین گزارش از ایران) می باشند.

۲۷ (۱۶/۸ درصد) ایزوله از ۱۶۱ (۷۶/۷ درصد) ایزوله ESBLs مثبت حامل ژن *bla*_{TEM} از نوع (۱۰۰٪ *bla*_{TEM-I}) و هیچ ایزوله که حامل ژن *bla*_{SHV} یافت نشد.

جدول ۴-۹ فراوانی ژن های *bla*_{CTX-M-15}، *bla*_{CTX-M-12} و *bla*_{TEM-I} در ایزوله های اشریشیا

کلی پس از انجام تعیین توالی

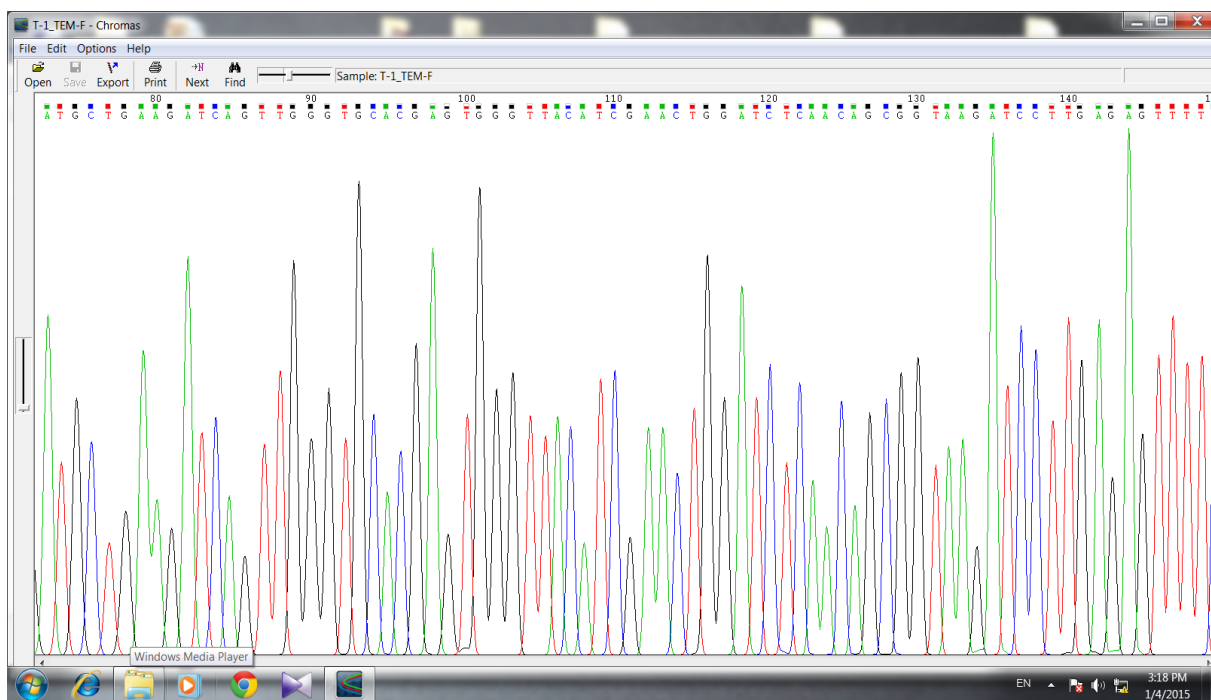
گروه ژنی	ژن	N(%)
<i>bla</i> _{CTX-M-I} N=86	<i>bla</i> _{CTX-M-12}	3(3.5%)
	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	83(96.5%)
<i>bla</i> _{TEM} N=27	<i>bla</i> _{TEM-I}	27(100%)



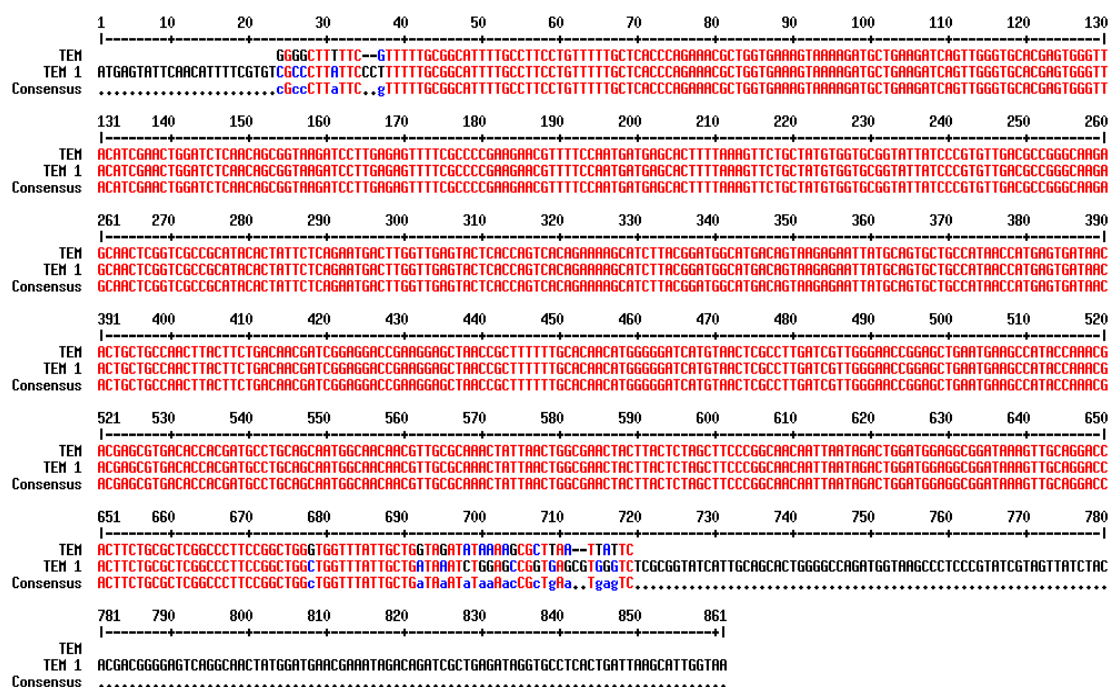
شکل ۴-۶ نمای از تعیین توالی ژن *bla* CTX-M-15 در اشریشیا کلی مولد ESBLs

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
CTX-M	GGCAGCT--GCCTACGCGACGGCA--CCGTCACGCTGTGTTAGGAAGTGTGCCGCTGTATGCGCAACGGCGGACGTACAGCAAAACTTGCCGATTAGAGCGGCAGT													
CTX-M-15	ATGGTTAAAAATCACTGCGCAGCTTCACGCTATGCGACGGCAACCGTCACGCTGTGTTAGGAAGTGTGCCGCTGTATGCGCAACGGCGGACGTACAGCAAAACTTGCCGATTAGAGCGGCAGT													
ConsensusGcCAGcT...GcCgAacGCGACGGCA..CCGTCACGCTGTGTTAGGAAGTGTGCCGCTGTATGCGCAACGGCGGACGTACAGCAAAACTTGCCGATTAGAGCGGCAGT													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
CTX-M	CGGGAGGCGAGCTGGGTGTGGCATTGATTACACAGCAGATTAATTCGCAATACCTTTATCGTGTGATGAGCGCTTTGCGATGTGCAGCACCAGTAAGTGTATGGCCGCGCCGCGGTGCTGAAGAAAG													
CTX-M-15	CGGGAGGCGAGCTGGGTGTGGCATTGATTACACAGCAGATTAATTCGCAATACCTTTATCGTGTGATGAGCGCTTTGCGATGTGCAGCACCAGTAAGTGTATGGCCGCGCCGCGGTGCTGAAGAAAG													
Consensus	CGGGAGGCGAGCTGGGTGTGGCATTGATTACACAGCAGATTAATTCGCAATACCTTTATCGTGTGATGAGCGCTTTGCGATGTGCAGCACCAGTAAGTGTATGGCCGCGCCGCGGTGCTGAAGAAAG													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
CTX-M	TGAAAGCGAACCGAATCTGTTAAATCAGCGAGTTGAGATCAAAATCTGACCTTGTAACTATATCTCGATTGCGGAAGACAGCTCAATGGGACGATGTCTACTGCTGAGCTTAGCGCGCCGCGCTA													
CTX-M-15	TGAAAGCGAACCGAATCTGTTAAATCAGCGAGTTGAGATCAAAATCTGACCTTGTAACTATATCTCGATTGCGGAAGACAGCTCAATGGGACGATGTCTACTGCTGAGCTTAGCGCGCCGCGCTA													
Consensus	TGAAAGCGAACCGAATCTGTTAAATCAGCGAGTTGAGATCAAAATCTGACCTTGTAACTATATCTCGATTGCGGAAGACAGCTCAATGGGACGATGTCTACTGCTGAGCTTAGCGCGCCGCGCTA													
	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520
CTX-M	CAGTACAGCGATACGTTGGCGATGATAGCTGATTGCTCAGCTTGGCGGCCCGGCTAGCGTCACCGCGTTCCGCCGACAGCTGGGAGACGAACGTTCCGCTCAGCCGTACCGAGCCGACGTTAAACA													
CTX-M-15	CAGTACAGCGATACGTTGGCGATGATAGCTGATTGCTCAGCTTGGCGGCCCGGCTAGCGTCACCGCGTTCCGCCGACAGCTGGGAGACGAACGTTCCGCTCAGCCGTACCGAGCCGACGTTAAACA													
Consensus	CAGTACAGCGATACGTTGGCGATGATAGCTGATTGCTCAGCTTGGCGGCCCGGCTAGCGTCACCGCGTTCCGCCGACAGCTGGGAGACGAACGTTCCGCTCAGCCGTACCGAGCCGACGTTAAACA													
	521	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650
CTX-M	CCGCCATTCCGGCGATCCGCGTATACCACTTCACCTCGGGCAATGGCGCAAACTCTGCGGAATCTGACGCTGGGTAAAGCATTGGGCGACAGCCAGCCGGCGAGCTGGTGACATGGATGAAGGGCA													
CTX-M-15	CCGCCATTCCGGCGATCCGCGTATACCACTTCACCTCGGGCAATGGCGCAAACTCTGCGGAATCTGACGCTGGGTAAAGCATTGGGCGACAGCCAGCCGGCGAGCTGGTGACATGGATGAAGGGCA													
Consensus	CCGCCATTCCGGCGATCCGCGTATACCACTTCACCTCGGGCAATGGCGCAAACTCTGCGGAATCTGACGCTGGGTAAAGCATTGGGCGACAGCCAGCCGGCGAGCTGGTGACATGGATGAAGGGCA													
	651	660	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760	770	780
CTX-M	TACCACCGGTGACGCGAGCATTCAAGCTGGACTGCTGCTTCTGGGTTGTGGGGATAAACCGGCGAGCGTGGCTATGGCACCACACGATATCGCGGTGATCTGGCCAAAGATCGTGCCCGCTG													
CTX-M-15	TACCACCGGTGACGCGAGCATTCAAGCTGGACTGCTGCTTCTGGGTTGTGGGGATAAACCGGCGAGCGTGGCTATGGCACCACACGATATCGCGGTGATCTGGCCAAAGATCGTGCCCGCTG													
Consensus	TACCACCGGTGACGCGAGCATTCAAGCTGGACTGCTGCTTCTGGGTTGTGGGGATAAACCGGCGAGCGTGGCTATGGCACCACACGATATCGCGGTGATCTGGCCAAAGATCGTGCCCGCTG													
	781	790	800	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900	910
CTX-M	ATTCTGGTCACTTACTTACCCAGCCTCAACCTAAGGCAGAAAGCCGTCGCGATGATTAGCGTCGGCGG--TAATTTTCCCCACAAATATAAAGAAAGGGGGGAAAAAAGGAAAGGG													
CTX-M-15	ATTCTGGTCACTTACTTACCCAGCCTCAACCTAAGGCAGAAAGCCGTCGCGATGATTAGCGTCGGCGG--TAATTTTCCCCACAAATATAAAGAAAGGGGGGAAAAAAGGAAAGGG													
Consensus	ATTCTGGTCACTTACTTACCCAGCCTCAACCTAAGGCAGAAAGCCGTCGCGATGATTAGCGTCGGCGG--TAATTTTCCCCACAAATATAAAGAAAGGGGGGAAAAAAGGAAAGGG													
	911	920	930	940	950	960	971							
CTX-M	GAGGGGAAAGGAAAAATATATAAATTAAGTTAAATGATTATATATATATATATAT													
CTX-M-15	GAGGGGAAAGGAAAAATATATAAATTAAGTTAAATGATTATATATATATATATAT													
Consensus													

شکل ۴-۷ Alignment ژن *bla* CTX-M-15 در ایزوله اشریشیا کلی مولد ESBLs



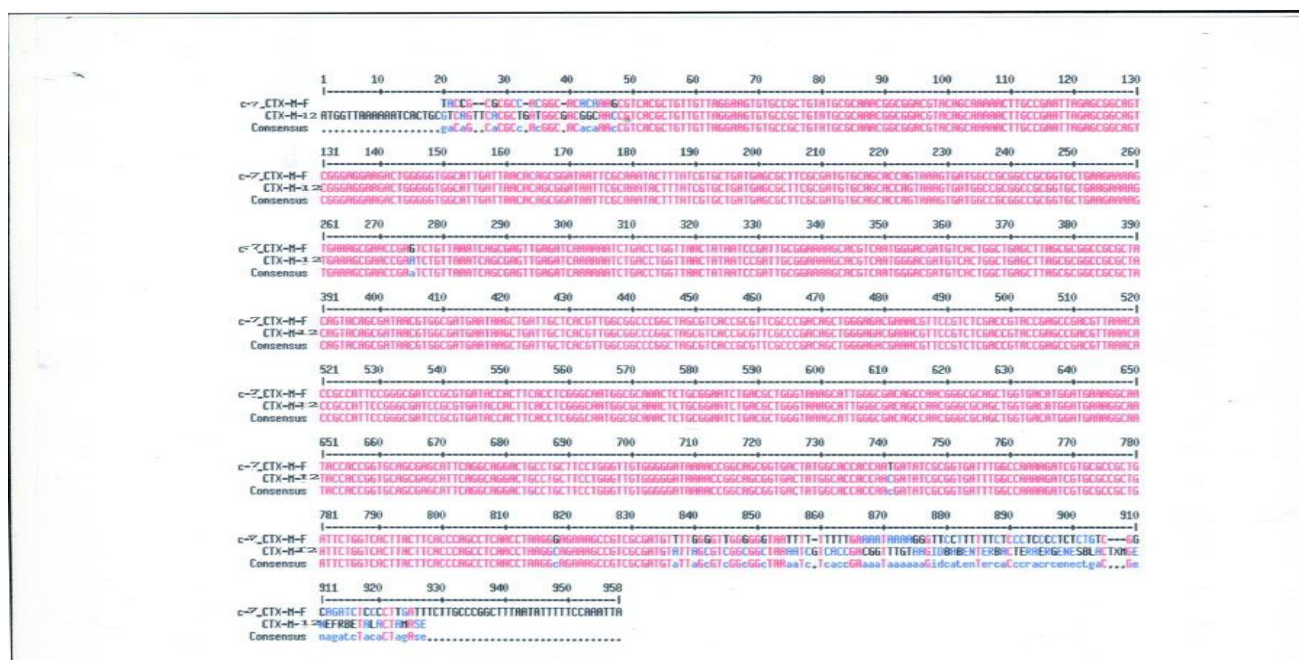
شکل ۴-۸ نمایشی از تعیین توالی ژن *bla*_{TEM-1} در اشریشیاکلی مولد ESBLs



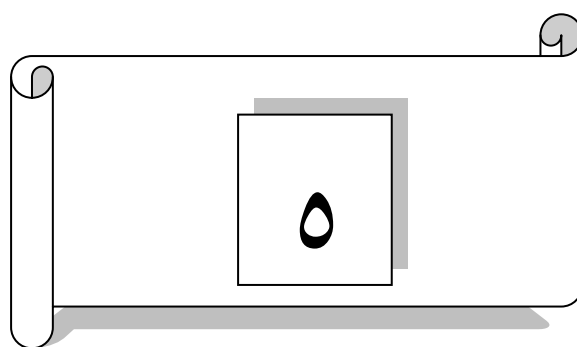
شکل ۴-۹ Alignment ژن *bla*_{TEM-1} در ایزوله اشریشیاکلی مولد ESBLs



شکل ۴-۱۰ نمایش از تعیین توالی ژن *bla* CTX-M-12 در اشریشیا کلی مولد ESBLs



شکل ۴-۱۱ Alignment ژن *bla* CTX-M-12 در ایزوله اشریشیاکلی مولد ESBLs



بخش پنجم

بحث و نتیجه گیری

مقاومت آنتی بیوتیکی در بین باکتری ها از سال های دور یکی از مشکلات بهداشتی درمانی در سطح دنیا بوده است. بیماران بستری در ICU در معرض خطر بیشتری برای ابتلای به عفونت های بیمارستانی می باشند، به طوریکه تقریباً ۲۵٪ عفونت های بیمارستانی و ۹۰٪ طغیان ها در بخش های مراقبت ویژه بیمارستان ها رخ می دهد. لذا بخش های مراقبت ویژه از قسمت های خطیر بیمارستان می باشند. باسیل های گرم منفی با مقاومت چند گانه از پاتوژن های مهم بخش های ICU می باشند که سبب نرخ بالای مرگ و میر در بیماران بستری در این بخش ها می گردد [۲۲۷ و ۱۵۴-۱۵۳].

در این میان، *E.coli* شایعترین علت ایجاد عفونت های مجاری ادراری و همچنین یک پاتوژن مهم در مننژیت نوزادان و عفونت های تنفسی و سپسیس در بیماران بستری در بخش های مختلف بیمارستان بویژه بخش مراقبت های ویژه می باشند. مقاومت آنتی بیوتیکی در بین سویه های *E.coli* بسیار شایع است و این به سبب کسب فاکتورهای مقاومت متعدد می باشد [۲۲۷ و ۱۵۵].

در طی سال های اخیر ظاهر شدن سویه های با الگوی مقاومت دارویی چند گانه (MDR) و سویه های مقاوم به سفالوسپورین های نسل سوم، درمان بیماران الوده به این ارگانیزم ها را مشکل تر و پیچیده تر ساخته است [۱۵۶-۱۵۷]. بتالاکتامازهای طیف گسترش یافته یا ESBLs اخیراً به عنوان یکی از مشکلات بهداشتی درمانی نوپدید در سطح دنیا مطرح شده اند. این نوع بتالاکتامازها باعث ایجاد مقاومت گسترده نسبت به اغلب آنتی بیوتیک های بتالاکتام همچون پنی سیلین ها و سفالوسپورین ها و منوباکتام ها شده و در نتیجه سبب کاهش اثر بخشی این آنتی بیوتیک ها در درمان عفونت های ناشی از باکتری های مولد این نوع آنزیم ها می گردد. از جمله مهمترین بتالاکتامازهای وسیع الطیف می توان آنزیم های نوع CTX-M-1، TEM، SHV را نام برد. درباکتری های گرم منفی، آنزیم های بتالاکتاماز در

فضای پری پلاسمی قرار دارند. ژن های این نوع بتالاکتامازها اغلب بر روی پلاسمید قرار گرفته و به سهولت توانایی انتشار مقاومت در بین سویه های مختلف را دارا می باشند. که می تواند سبب بروز عفونت های بیمارستانی گسترده به واسطه این نوع باکتری ها گردد. از آنجایی که نتایج آنتی بیوگرام می تواند با حضور ESBLs در تناقض باشد. لذا تشخیص صحیح ESBLs ها و تعیین مقاومت به سفالوسپورین ها و بتالاکتام ها در آزمایشگاه های تشخیص طبی می تواند کمک موثری در تعیین رژیم درمانی مناسب باشد. از آنجایی که این نوع بتالاکتاماز ها به مهار کننده های بتالاکتاماز چون کلاولانیک اسید، سولباکتام و تازوباکتام حساس می باشند. لذا از این نوع ترکیبات می توان در تشخیص این نوع بتالاکتامازها استفاده نمود. همچنین یکی دیگر از مکانیسم های مهم مقاومتی در میان باکتری های گرم منفی، تولید سفالوسپورینازهای کروموزومی گروه C، همچون بتالاکتامازها AmpC می باشد. این آنزیم ها می توانند به واسطه پلاسمید در میان بسیاری از ایزوله های بالینی به ویژه خانواده انتروباکتریاسه منتشر شده و مقاومت به سفالوسپورین ها و تعداد دیگری از آنتی بیوتیک ها را ایجاد می نماید. امروزه، ایزوله هایی که هم آنزیم های بتالاکتاماز ESBLs و هم AmpC را تولید می کنند در حال افزایش است که این امر، مقاومت بالایی را نسبت به عوامل ضد میکروبی ایجاد کرده است. از آنجایی که این نوع بتالاکتامازها به کلاولانیک اسید مقاوم می باشند، معضلات فراوانی را در جهت شناسایی آنزیم های بتالاکتاماز وسیع طیف از طریق پوشاندن اثر آن ها در تست های فنوتیپی تأییدی، اعمال می کنند. لذا امروزه از کلوگزاسیلین به عنوان مهار کننده AmpC بتالاکتامازها در تست های تاییدی فنوتیپی ESBLs استفاده می کنند [۲۲۱-۲۲۰ و ۱۷۲]. از آنجایی که بیماران بستری در ICU دامنه وسیعی از اختلالات عملکردی را دارا بوده و همچنین مداخلات تهاجمی به ویژه کاتترها و سوند های ادراری در این بیماران به گستردگی استفاده می گردد، لذا این عوامل، به عنوان عوامل خطر و زمینه ساز در ایجاد عفونت ها در این بیماران نقش مهمی را دارا می باشد. همچنین نبود ابزارها و راهکارهای مناسب

کنترل عفونت از دلایل عمده شیوع این نوع عفونت ها در بخش های ICU می باشد. با توجه به اهمیت موضوع لذا در این مطالعه بررسی فراوانی ESBLs، در سویه های یوروپاتوژن *E.coli* جدا شده از بیماران بستری در ICU و بررسی آنان با استفاده از روش های فنوتیپی و مولکولی هدف قرار داده شد. در این مطالعه در مجموع ۲۱۰ اشریشیاکلی از مراکز بیمارستانی شهرهای قزوین، کرج و تهران جداسازی شدند. نتایج این مطالعه نشان داد که نقش مهم و قابل توجه این ارگانیزم ها در ایجاد عفونت هایی به ویژه عفونت های وابسته به ابزارهای تهاجمی از جمله سوند های ادراری تاکید دارد. همچنین در این مطالعه، ایزوله های اشریشیاکلی از بیماران بستری در بخش های مراقبت ویژه (ICU) جمع آوری شدند. به نظر می رسد بستری طولانی مدت بیماران در این بخش، وخیم بودن حال بیماران، به کار بردن ابزارهای تهاجمی درمانی از قبیل تراشه، ونتیلاتور، سوند های ادراری و کاتتر، مواجه بودن با آنتی بیوتیک های وسیع الطیف و نهایتاً نبود ابزارها و راهکارهای مناسب کنترل عفونت از دلایل عمده شیوع ارگانیزم های مقاوم در این بخش می باشد [۲۲۷].

از آنجایی که در این مطالعه ۱۶۱ (۷۶/۷٪) از ایزوله های یوروپاتوژن *E.coli* جدا شده از بیماران ICU دارای ESBLs می باشند. لذا مقاومت بالایی نسبت به سفالوسپورین های مورد مطالعه مشاهده گردید. سفودوکسیم ۱۶۱ (۷۶/۷٪)، سفوتاکسیم ۱۵۴ (۷۳/۳٪)، سفتریاکسون ۱۵۲ (۷۲/۴٪)، سفتازیدیم ۱۱۴ (۵۴/۳٪)، سفیم ۱۱۲ (۵۳/۳٪)، ایمپینم ۱۱۰ (۵۲/۴٪)، ازترونام ۱۰۵ (۵۰٪) و سفوکسیتین ۴۵ (۲۱/۴٪). کارباپنم ها از داروهای انتخابی در درمان باکتری های گرم منفی مولد ESBLs می باشند ولیکن با کسب مکانیزم های مقاومتی متعددی همچون تولید کارباپنمازها، کاهش نفوذپذیری، پمپ های افلاکس و سایر موارد، میزان مقاومت نسبت به این گروه از بتالاکتام ها نیز به سرعت در حال افزایش می باشد به طوری که ۱۱۰ (۵۲/۴٪) از ایزوله های *E.coli* در این مطالعه نیز نسبت به ایمپینم مقاوم می باشند.

همچنین ۴۵ (۲۱/۴٪) از سویه ها نسبت به سفوکسیتین عدم حساسیت نشان می دهند که می تواند در نتیجه تولید AmpC بتالاکتامازها باشد. نتایج تست های غربالگری نشان داد که ۱۶۶ (۷۹٪) ایزوله دارای نتیجه مثبت بوده و ۱۶۱ (۷۶/۷٪) ایزوله دارای تست فنوتیپی مثبت می باشند. همچنین نتایج تست های فنوتیپی تاییدی نشان داد که ۴ (۲/۵٪) از ایزوله هایی که دارای تست غربالگری مثبت بودند، تنها با روش دیسک ترکیبی در محیط حاوی کلوزاسیلین مثبت شدند.

در این مطالعه بیشترین مقاومت نسبت به سفپودوکسیم، سفوتاکسیم و سفتریاکسون به ترتیب (۷۶/۷٪)، (۷۳/۳٪)، (۷۲/۴٪) مشاهده شد. در مطالعه ای که توسط Mohammadimehr و همکاران در سال ۱۳۸۹ بر روی ایزوله های بیمارستان گلستان ارتش انجام گرفت مقاومت به آنتی بیوتیک های سفوتاکسیم (۶۱/۱۱٪)، سفتازیدیم (۶۳/۸۹٪)، سفپیم (۶۶/۶۶٪) و سفتریاکسون (۶۳/۸۸٪) گزارش گردید [۲۲۷]. Panahi و همکاران در ایران سال ۱۳۸۷ طی مطالعه ای که انجام گرفت، شیوع سویه های مقاوم در ICU، به سفتازیدیم و سفتریاکسون ۶٪ گزارش شده است [۲۳۱]. Mohajeri و همکاران در سال ۱۳۹۰ در کرمانشاه میزان مقاومت به سفالوسپورین های نسل سوم بین ۶۳-۷۵٪ را گزارش کردند [۲۲۶]. در تحقیقی که Mobarak و همکاران در لبنان انجام دادند تمامی ایزوله های اشریشیاکلی مقاوم به سفتازیدیم بودند که نسبت به مطالعه حاضر تفاوت قابل ملاحظه ای دارد [۱۹۸]. مطالعه ای که در سال ۲۰۰۸ در مالزی توسط Zambari و همکاران انجام گرفت، تقریباً ۱۰۰٪ ایزوله های اشریشیاکلی مقاوم به سفتازیدیم و سفوتاکسیم بودند [۲۰۳]. در تحقیقی دیگر در مصر توسط Nevine و همکاران ۹۰-۱۰۰٪ از کل ایزوله های اشریشیاکلی مقاوم به آزترونام گزارش شد [۲۳۵]، در حالی که این میزان در مطالعه حاضر ۵۰٪ در ایزوله های اشریشیاکلی مقاوم نشان داد. Meyer و همکاران طی یک پژوهش در آلمان

که مقاومت به سفالوسپورین های نسل سوم ۱۰/۵٪ گزارش شده است که با مطالعه حاضر تفاوت فاحشی دارد [۲۲۴].

فراوانی اشريشياکلی تولید کننده ESBL در کشورهای مختلف به شرح ذیل گزارش گردیده است: در مطالعات انجام شده در سال ۲۰۱۰ در نیجریه ۳۶/۸٪ [۱۷۱] و همینطور در مطالعه ای در ترکیه در سال ۲۰۱۱ ۸۷٪ [۱۵۴] بود. سال ۲۰۰۶ در پاکستان ۵۳/۳٪ [۱۹۵]، سال ۲۰۰۶ در فرانسه ۴٪ [۲۰۰]، سال ۲۰۰۵ در لبنان ۱۳/۳٪ [۱۹۸]، سال ۲۰۰۵ در آلمان ۱۰/۳٪ [۱۹۹]، سال ۲۰۰۵ در اسپانیا ۵۱/۸٪ [۱۹۴]، سال ۲۰۰۴ در کره ۹/۲٪ [۱۹۷]، سال ۲۰۰۴ در ترکیه ۱۷٪، سال ۲۰۰۴ در بنگلادش ۴۳/۲٪ [۲۰۱] سال ۲۰۰۲ در هندوستان ۶۸٪ [۱۹۶]، سال ۲۰۰۳ در ایالات متحده ۱۰-۲٪ و سال ۲۰۰۲ در چین ۱۳-۳۵٪ [۲۰۰-۲۰۱]، در مطالعه ای در هندوستان که در سال ۲۰۰۶ صورت گرفت ۴۶/۵۱٪ از ایزوله های اشريشيا کلی، ESBL مثبت گزارش شد [۱۵۱]. همچنین در مطالعه دیگری که توسط Razazi و همکاران (۲۰۱۲) در فرانسه در یک پریود زمانی ۸ ماهه انجام شد. ۵۱ (۶۲٪) ایزوله ها را اشريشياکلی ESBL مثبت تشکیل می داد [۲۳۲]. در مطالعه دیگری که توسط Yazdi و همکاران (۱۳۹۰) در تهران در یک دوره ۸ ماهه مورد بررسی قرار گرفت، ۱۰۹ (۴۴/۳٪) ایزوله مولد ESBLs بودند با توجه به مطالعه حاضر از آمار پایین تری برخوردار بود [۲۳۰]. Mobaiyen و همکاران در طول یک دوره یک ساله (۲۰۰۹-۲۰۱۰)، ایزوله های اشريشيا کلی جدا شده از بیماران بستری در بخشهای مراقبت ویژه در بیمارستان امام رضا تبریز را مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که ۳۰ ایزوله (۹۳/۷٪) مولد ESBLs بودند. که نسبت به مطالعه حاضر از آمار بالاتری برخوردار بود [۲۱۴]. Rubio-Prerez و همکاران (۲۰۱۲) در طی یک مطالعه دو ساله در بیمارستان های مادرید انجام شد. نتایج مطالعه نشان داد که ۱۵۸ (۷۲٪) ایزوله مولد ESBLs می باشند که در مقایسه با مطالعه حاضر تقریباً همخوانی داشته است در

ضمن اکثر ایزوله ها از بخش مراقبت ویژه جداسازی شده بود [۲۱۳]. Gupta و Sharma (۲۰۱۲) طی یک مطالعه ۶ ماهه (۲۰۱۰-۲۰۱۱) در بمبئی هند، ۱۷۹ (۷۸/۵۰٪) ایزوله مولد ESBLs بودند که اکثر ایزوله ها از ICU جمع آوری شده بود، که در مقایسه با مطالعه حاضر تقریباً همخوانی داشته است [۲۲۱]. در مجموع با بررسی بیشتر مشخص می شود که شیوع ارگانیزم های مولد ESBLs در ایزوله های بیمارستانی و حتی اکتسابی از جامعه در نتایج مطالعات مختلف نشانگر مقاومت بالا نسبت به آنتی بیوتیک های بتالاکتام بویژه سفالوسپورین ها در میان ایزوله های *E.coli* می باشد. اما از آنجای که الگوی مقاومت وابسته به میزان مصرف الگوی آنتی بیوتیک و انتشار ژن های مقاومت و نحوه بکارگیری ابزارهای کنترل عفونت در بخش های مختلف بیمارستانی و همچنین دارای شیوع جغرافیایی و توزیع فراوانی متفاوت می باشد. لذا اختلافات مشاهده شده در نتایج این مطالعات می تواند وابسته به این عوامل و یا تفاوت در زمان انجام مطالعه و تعداد نمونه های بررسی شده همچنین ایزوله های جدا شده از ICU نسبت به سایر بخش ها می تواند از درصد مقاومت بالای برخوردار باشد.

بررسی مولکولی و تعیین ژن های مولد ESBLs نشان داد که فراوانی ژن های CTX-M-I *bla*_{۸۶} (۵۳/۴٪) و ژن *bla*_{TEM} ۲۷ (۱۶/۸٪) بود که ۱۶ (۱۰٪) از این ایزوله ها هر دو ژن CTX-M-I *bla* و *bla*_{TEM} را به طور هم زمان دارا بودند. ژن *bla*_{SHV} در هیچ یک ایزوله ها مشاهده نشد. نتایج تعیین توالی نشان داد که ۹۶/۵٪ از ایزوله های مولد *bla*_{CTX-M-I} از نوع *bla*_{CTX-M-15} و ۳/۵٪ آنها از نوع *bla*_{CTX-M-12} اولین گزارش از ایران می باشد. و تمامی ژن های *bla*_{TEM} در این مطالعه از نوع *bla*_{TEM-1} می باشد. Mobayen و همکاران در طول یک دوره یک ساله، بخش های مراقبت ویژه بیمارستان امام رضا تبریز را مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند، از ۳۰ (۹۳/۷٪) ایزوله مولد ESBLs ۸۷/۵٪ واجد ژنهای *bla*_{TEM} و ۱۲/۵٪ واجد ژنهای *bla*_{SHV} و ۳۱/۲٪ *bla*_{CTX-M} را داشت که نسبت به مطالعه حاضر ژنهای *bla*_{TEM}

و *bla*_{SHV} بالاتر نشان داد در حالیکه ژن *bla*_{CTX-M} نسبت به مطالعه حاضر از فراوانی کمتری برخوردار بود [۲۱۴]. در مطالعه ای که توسط SoltanDallal و همکاران انجام گرفت، تایید حاصل نشان داد از ۱۲۸ (۶۴/۱٪) ایزوله مولد ESBLs که ۷۴ (۶۴/۳٪) ایزوله حاوی ژن *bla*_{TEM} و ۹۹ (۸۶/۰۸٪) حاوی ژن *bla*_{CTX-M-I} تشخیص داده شد [۲۲۹]. مطالعه ای که در سال ۲۰۰۸ در مالزی توسط Zamberi و همکاران انجام گرفت ۷۵٪ از ایزوله ها حاوی ژن *bla*_{TEM} گزارش شد [۲۰۳]. همچنین در مطالعه ای دیگر که توسط Jeong و همکاران در سال ۲۰۰۵ در کره جنوبی ۷۸/۳٪ از کل ایزوله های ESBL مثبت *E.coli* دارای ژن *bla*_{TEM} بودند [۱۹۷]. Yazdi و همکاران (۱۳۹۰) در ایران در طی یک مطالعه شیوع ژن های مقاومت بتالاکتاماز *bla*_{TEM}، *bla*_{CTX-M} و *bla*_{SHV} در *E.coli* را مورد بررسی قرار دادند. ژن های *bla*_{TEM}، *bla*_{CTX-M} و *bla*_{SHV} به ترتیب (۸۷/۱٪)، (۶۸/۸٪) و (۷۰/۶٪) ۷۷ ایزوله های مولد ESBLs یافت شد [۲۳۰]. این در حالی است که در مطالعه حاضر فراوان ترین گروه ژنی در بین ایزوله های بررسی شده *bla*_{CTX-M-I} ۸۶ (۵۳/۴٪) ایزوله و فروانترین ژن از نوع *bla*_{CTX-M} ۸۳/۱۵ (۹۶/۶٪) ایزوله بود. همچنین این مطالعه موفق به جداسازی CTX-M از نوع *bla*_{CTX-M-12} در بین ۵۲ (۲۴/۸٪) ایزوله جمع آوری شده از بیمارستان امام خمینی کرج، که ۲۴ (۴۶/۱٪) ایزوله حامل ژن *bla*_{CTX-M-I} که ۳ (۳/۵٪) ایزوله آن حامل ژن *bla*_{CTX-M-12} گردید. بر اساس بررسی های انجام شده توسط ما، این اولین گزارش از ایران از ایشریشیاکلی می باشد. در مطالعه دیگری که توسط Edelstein و همکاران در روسیه انجام گرفت، نتایج حاصل (۳۵/۸٪) ایزوله از آنها حاوی ژن *bla*_{CTX-M} تشخیص داده شد که با توجه به مطالعه حاضر از آمار پایین تری برخوردار بود [۱۵۴]. در مطالعه دیگری که توسط Copur Cicek و همکاران در ترکیه در طی سال های ۲۰۱۱ الی ۲۰۱۲ صورت گرفت، نتایج حاصل ۳۶۶ (۸۳/۱۸٪) ایزوله حاوی ژن *bla*_{CTX-M-I}، ۱۹۴ (۴۴٪) ایزوله حاوی ژن *bla*

TEM و ۸ (۱/۸٪) ایزوله حاوی ژن *bla*_{SHV} گزارش شد [۲۳۶]. در مطالعه دیگری که توسط Baudry و همکاران از بیماران بستری در ICU از کانادا صورت گرفت، ۵/۵٪ از ایزوله های اشریشیاکلی ESBL مثبت حاوی ژن *bla* CTX-M-I تشخیص داده، که نسبت به مطالعه حاضر شیوع پایین تری را نشان داده بود [۲۳۷]. Martinez و همکاران در سال ۲۰۱۱ از والدپاردر کلمبیا از ۱۰۲ ایزوله اشریشیا-کلی جدا شده از نمونه های ادرار، ۵۸٪ واجد ژن *bla*_{CTX-M} بود که با مطالعه ما هم خوانی داشت [۲۱۸]. در مطالعه ی که توسط Peter-Getzlaff در نیوزلند در سال ۲۰۱۱ انجام گرفت از ۵۱ ایزوله جمع آوری شده از اشریشیاکلی ۲۱ (۴۱٪) ایزوله AmpC مثبت، همچنین نتایج تست های فنوتیپی تاییدی نشان داد که ۲۰ (۹۵/۲٪) از ایزوله هایی که دارای تست غربالگری مثبت بودند، تنها با روش دیسک ترکیبی در محیط حاوی کلوزاسیلین مثبت شدند [۲۳۸].

۵-۲ نتیجه گیری:

نتایج نهایی حاصل از این مطالعه حاکی از آن است که باکتری های جنس اشریشیاکلی مولد بتالاکتاماز در مراکز بیمارستانی مورد مطالعه، دارای شیوع بالا و قابل توجهی می باشند. افزایش میزان این نوع باکتری ها می تواند ناشی از انتشار این نوع مقاومت در نتیجه تجویز و مصرف غیر منطقی آنتی بیوتیک ها و عدم بهره گیری از ابزارهای کنترل عفونت باشد. با توجه به نقش قابل توجه ارگانسیم های تولید کننده آنزیم ها ESBLs در ایجاد انواع عفونت ها و همچنین افزایش میزان مرگ و میر خصوصا در بیماران بستری در بخش های مراقبت ویژه بیمارستانی، شناسایی این ایزوله ها از اهمیت ویژه ای برخوردار است. ارگانسیم های تولید کننده بتالاکتاماز های نوع ESBLs از اهمیت ویژه ای برخوردار است. شناسایی ESBLs به روش دیسک ترکیبی روش مناسبی است به ویژه هنگامی که به منظور جلوگیری از اثر همپوشانی AmpC بتالاکتاماز ها از محیط حاوی کلوزاسیلین استفاده شود. شناسایی به موقع و درمان قطعی این سویه ها با

آنتی بیوتیک های مناسب خطر گسترش سویه های مقاوم را در بیماران کاهش می دهد. در مطالعه حاضر تعیین *bla* CTX-M-I به عنوان فراوان ترین گروه ژنی و *bla* CTX-M-15 به عنوان فراوان ترین ژن و *bla* CTX-M-12 به عنوان اولین گزارش از ایران از ایزوله اشریشیا کلی قابل توجه می باشد. کاربایتم ها از داروهای انتخابی در درمان باکتری های گرم منفی مولد ESBLs می باشند ولیکن با کسب مکانیزم های مقاومتی، میزان مقاومت نسبت به این گروه از بتالاکتام ها نیز به سرعت در حال افزایش می باشد به طوری که ۵۲/۴٪ از ایزوله های *E. coli* در این مطالعه نیز نسبت به ایمپنم مقاوم می باشند. از آنجایی که اشریشیا کلی مولد ESBLs در بیماران بخش ICU از شیوع بالایی برخوردار است لذا گسترش مقاومت به کاربایتم ها در انتخاب رژیم درمانی این بیماران می بایست مورد توجه قرار گیرد.

۳-۵ پیشنهادات:

- با توجه به درصد بالای باکتریهای تولید کننده ESBL آنزیم های بتا لاکتاماز طیف گسترده محدود شدن مصرف سفالوسپورین های نسل سوم جهت درمان و تجویز آنتی بیوتیک های مناسب با انجام دقیق تست حساسیت توصیه می گردد.
- بررسی ایزوله های بالینی بخش های ICU از نظر تولید آنزیم های بتا لاکتاماز طیف گسترده (ESBLs)، به طور منظم توصیه می شود.
- با توجه به درصد بالای مقاومت به سفوکسیتین پیشنهاد می گردد. ایزوله های *E. coli* از نظر AmpC بتالاکتاماز هم مورد بررسی قرار گیرند.
- همچنین به دلیل وجود اثر هم پوشانی AmpC بتالاکتامازها و ESBLs تاییدی فنوتیپی ESBLs در محیط مولر هیتون آگار از "گلوکزاسیلین به عنوان مهار کننده AmpC بتالاکتامازها استفاده گردد.

- با توجه به افزایش روز افزون تیپ های مختلف آنزیمهای ESBL و تاثیر نابرابر آنها بر روی آنتی بیوتیک های مختلف، در ادامه این مطالعات تعیین دقیق تیپ های آنزیمی و ژن های کد کننده آنها توصیه می گردد.
- همچنین به منظور کمک به کنترل عفونت تعیین تیپ ایزوله های در گردش در بخش های ICU با استفاده از روش های تعیین تیپ مولکولی به کارگیری روش هایی همچون PCR-RFLP، REP-PCR و تعیین توالی نوکلئوتیدی (Sequencing) توصیه می گردد.
- به جهت کنترل فراوانی اشريشياکلی مولد ESBLs، باید راه های انتشار آن را از طریق ضد عفونی کردن با شوینده های با پایه الکلی محدود کرد، مثلاً شستشوی دست ها قبل و بعد از تماس با بیمار، دقت در استریل کردن وسایل بیمار و دستگاه ها و محدود کردن تزریقات داخل وریدی، همچنین باید به بیماران و کمک بهیاران که به مریض کمک می کنند راه های پیشگیری از آلودگی را نیز آموزش داد. همچنین امید است با بهره گیری از الگوی صحیح مصرف آنتی بیوتیک و محدود سازی استفاده از داروهای بتالاکتام به ویژه سفالوسپورین های طیف گسترده و به کار گیری برنامه های چرخشی مصرف آنتی بیوتیک ها و شاهد کاهش شیوع سویه های مولد بتالاکتامازهای طیف گسترده و سایر الگوهای مقاومت دارویی در بخش های بیمارستانی به ویژه بخش های مراقبت ویژه باشیم. همچنین انجام این نوع مطالعات می تواند به کمیته های کنترل عفونت از جهت طراحی و برنامه ریزی، برنامه های کنترل عفونت بیمارستان ها و کاهش بروز عفونت های بیمارستانی و انتشار مقاومت کمک کرده و در تعیین رژیم درمان مناسب از سوی پزشکان به خصوص در درمان عفونت های جدی و مهم ICU کمک کننده باشد.

1. Mulvey MR, Simor AE. Antimicrobial resistance in hospitals: how concerned should we be? CAMJ 2009; 180 (4): 408-415
2. Mendonça N, Manageiro V, Robin F, Salgado MJ, Ferreira E, Canic M and et al. The lys 234Arg substitution in the enzyme SHV-72 is a determinant for resistance to clavulanic acid inhibition. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52 (5): 1806-1811
3. Escudero E, Vinue L, Teshager T, Torres C, Moreno MA. Resistance mechanisms and farm-level distribution of fecal *Escherichia coli* isolates resistant to extended – spectrum cephalosporins in pigs in Spain. Res Vet Sci 2009; 88(1): 83-87
4. Falagas ME, Karageorgopoulos DE. Extended–spectrum β -lactamase producing Organisms. J Hosp Infect 2009; 73(4): 345-354
5. Riyahi Zaniani F, Meshkat Z, Naderi Nasab M, Esmaily H, Darban Hoseini M, Ghazvini K. The Prevalence of TEM and SHV Genes among Extended-Spectrum Beta-Lactamases Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. Iran J Basic Med Sci 2012;15(1):654-660.
6. Ruppé E, Hem S, Lath S, Gautier V, Arieu F, Sarthou J L, CTX-M β -Lactamases in *Escherichia coli* from Community-acquired Urinary Tract Infections, Cambodia. Emerg Infect Dis. 2009; 15(5):741-748.
7. Black C. Antibiotic susceptibility testing. Methods Mol Med 2005; 67 (6):89-106.
8. Brooks G.F, Carroll K.G. Butel J.S. Jawetz, Melnick, and Adelberg's Medical microbiology. 26th ed. Los Altos, CA: Appleton & Lange; 2013. 229-245.
9. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Review of medical microbiology. 7th ed. Philadelphia: Mosby; 2013.258-265.
10. Cheasty T, Smith H.R. *Escherichia*. In:Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS, Trevino EA. Bailey and Scott's diagnostic microbiology. 12th ed. St. Louis: Mosby; 2013.323-333.
11. Borriello SP, Murray PR, Funke G. Topley and Wilson's Bacteriology. 10th ed. London: Edward Arnold; 2005. 1360-1380.

12. Washington C. Winn, Stephen D. Allen, Stephen Allen, William M Janda, Elmer W. Koneman, Paul C. Schreckenberger, Gary W. Procop, Gail L. Koneman's color Atlas and Text Book of Diagnostic Microbiology, Gail Woods, 6th Edition, 2006.p;256-285.
13. Wolf MK: Occurrence, distribution, and associations of O and H erogroups, colonization factor antigens, and toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev 1997, 10(4):569-584.
14. Boriello SP, Murray PR, Funke G. *Citrobacter, Klebsiella, Enterobacter, serratia*, and other *Enterobacteriaceae*.Topley & Wilson's,10th Edition. London, Hodder Arnold,2006;1474 -1506.
15. Julia J. Williams, E.M.H., Toxin-Antitoxin (TA) Systems are Prevalent and Transcribed in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. 1) Published in final edited form as:FEMS Microbiol Lett. 2011 September ; 322(1): 41-50. doi:10.1111/j.1574-6968.2011.02330.x.
- 16.Mahon CR, Lehman D C, Manuselis G. Diagnostic Microbiology , 3th Edition, 2007.p; 28-512.
17. Nataro JP, Kaper JB: Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev 1998, 11(1):142-201.
- 18.Sheikh J, Czeczulin JR, Harrington S, Hicks S, Henderson IR, Le Bouguenec C, Gounon P, Phillips A, Nataro JP: A novel dispersin protein in enteroaggregative *Escherichia coli*. J Clin Invest 2.1337-1329(9)110,002.
- 19.Steiner TS, Nataro JP, Poteet-Smith CE, Smith JA, Guerrant RL: Enteroaggregative *Escherichia coli* expresses a novel flagellin that causes IL-8 release from intestinal epithelial cells. *J Clin Invest* 2000, 105(12):1769-1777.

20. Navarro-Garcia F, Eslava C, Villaseca JM, Lopez-Revilla R, Czeczulin JR, Srinivas S, Nataro JP, Cravioto A: In vitro effects of a high-molecular-weight heat-labile enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1998, 66(7):3149-3154.
21. Jiang ZD, Greenberg D, Nataro JP, Steffen R, DuPont HL: Rate of occurrence and pathogenic effect of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors in international travelers. *J Clin Microbiol* 2002, 40(11):4185-4190.
22. Nataro JP, Steiner T, Guerrant RL: Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* 1998, 4(2):251-261.
23. Varma JK, Greene KD, Reller ME, DeLong SM, Trottier J, Nowicki SF, DiOrio M, Koch EM, Bannerman TL, York ST *et al*: An outbreak of *Escherichia coli* O157 infection following exposure to a contaminated building. *Jama* 2003, 290(20):2709-2712.
24. Jones NL, Islur A, Haq R, Mascarenhas M, Karmali MA, Perdue MH, Zanke BW, Sherman PM: *Escherichia coli* Shiga toxins induce apoptosis in epithelial cells that is regulated by the Bcl-2 family. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000, 278(5):G811-819.
25. Reid SD, Herbelin CJ, Bumbaugh AC, Selander RK, Whittam TS: Parallel evolution of virulence in pathogenic *Escherichia coli*. *Nature* 2000, 406(6791):64-67.
26. Tatsuno I, Horie M, Abe H, Miki T, Makino K, Shinagawa H, Taguchi H, Kamiya S, Hayashi T, Sasakawa C: *toxB* gene on pO157 of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for full epithelial cell adherence phenotype. *Infect Immun* 2001, 69(11):6660-6669.
27. Alcamo ED, Heymann D. *Deadly Disease and Epidemics, Escherichia Coli Infection*. 2th Edition, in the United States of America, 2005;7-137.
28. Estrada-Garcia T, Lopez-Saucedo C, Thompson-Bonilla R, Abonce M, Lopez-Hernandez D, Santos JI, Rosado JL, DuPont HL, Long KZ: Association of diarrheagenic *Escherichia coli* Pathotypes with infection and diarrhea among

Mexican children and association of atypical Enteropathogenic *E. coli* with acute diarrhea. *J Clin Microbiol* 2009, 47(1):93-98.

29.Spangler BD: Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Microbiol Rev* 1992, 56(4):622-647.

30.Sears CL, Kaper JB: Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiol Rev* 1996, 60(1):167-215.

31.Pizza M, Giuliani MM, Fontana MR, Monaci E, Douce G, Dougan G, Mills KH, Rappuoli R, Del Giudice G: Mucosal vaccines: non toxic derivatives of LT and CT as mucosal adjuvants. *Vaccine* 17-19):2534-2541.(2001,

32.Morris NS, S.D., McLean RJ, The development of bacterial biofilms on indwelling urethral catheters. *World J Urol* 1999; 17: 45–50., 1999.

33.Wei J, Goldberg MB, Burland V, Venkatesan MM, Deng W, Fournier G, Mayhew GF, Plunkett G, 3rd, Rose DJ, Darling A *et al*: Complete genome sequence and comparative genomics of *Shigella flexneri* serotype 2a strain 2457T. *Infect Immun* 2003, 71(5):2775-2786.

34.Pupo GM, Lan R, Reeves PR: Multiple independent origins of *Shigella* clones of *Escherichia coli* and convergent evolution of many of their characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97(19):10567-10572.

35.Zychlinsky A, Prevost MC, Sansonetti PJ: *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. *Nature* 1992, 358(6382):167-169.

36. Sansonetti P: Host–pathogen interactions: the seduction of molecular cross talk. *Gut* 2002;50:iii2-iii8 doi:10.1136/gut.50.suppl_3.iii2.

37.Buchrieser C, Glaser P, Rusniok C, Nedjari H, D'Hauteville H, Kunst F, Sansonetti P, Parsot C: The virulence plasmid pWR100 and the repertoire of proteins secreted by the type III secretion apparatus of *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol* 2000, 38(4):760-771.

38.Goldberg MB, Theriot JA: *Shigella flexneri* surface protein IcsA is sufficient to direct actin-based motility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, 92(14):6572-6576.

Egile C, Loisel TP, Laurent V, Li R, Pantaloni D, Sansonetti PJ, Carlier MF: Activation of the CDC42 effector N-WASP by the *Shigella flexneri* IcsA protein promotes actin nucleation by Arp2/3 complex and bacterial actin-based motility. *J Cell Biol* 1999, 146(6):1319-1332.

Sansonetti PJ, Phalipon A, Arondel J, Thirumalai K, Banerjee S, Akira S, Takeda K, Zychlinsky A: Caspase-1 activation of IL-1 β and IL-18 are essential for *Shigella flexneri*-induced inflammation. *Immunity* 2000, 12(5):581-590.

41. Tran Van Nhieu G, Bourdet-Sicard R, Dumenil G, Blocker A, Sansonetti PJ: Bacterial signals and cell responses during *Shigella* entry into epithelial cells. *Cell Microbiol* 2000, 2(3):187-193.

42. Niebuhr K, Giuriato S, Pedron T, Philpott DJ, Gaits F, Sable J, Sheetz MP, Parsot C, Sansonetti PJ, Payrastre B: Conversion of PtdIns(4,5)P₂ into PtdIns(5)P by the *S. flexneri* effector IpgD reorganizes host cell morphology. *EMBO J* 2002, 21(19):5069-5078.

43. Hicks S, Candy DC, Phillips AD: Adhesion of enteroaggregative *Escherichia coli* to pediatric intestinal mucosa in vitro. *Infect Immun* 1996, 64(11):4751-4760.

Vial PA, Robins-Browne R, Lior H, Prado V, Kaper JB, Nataro JP, Maneval D, Elsayed A, Levine MM: Characterization of enteroadherent-aggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease. *J Infect Dis* 1988, 158(1):70-79.

45. Benjamin P, Federman M, Wanke CA: Characterization of an invasive phenotype associated with enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1995, 63(9):3417-3421.

46. Abe CM, Knutton S, Pedroso MZ, Freymuller E, Gomes TA: An enteroaggregative *Escherichia coli* strain of serotype O111:H12 damages and invades cultured T84 cells and human colonic mucosa. *FEMS Microbiol Lett* 2001, 203(2):199-205.

47. Czezulín JR, Balepur S, Hicks S, Phillips A, Hall R, Kothary MH, Navarro-García F, Nataro JP: Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen

mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1997, 65(10):4135-4145.

48. Nataro JP, Yikang D, Yingkang D, Walker K: AggR, a transcriptional activator of aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1994, 176(15):4691-4699.

49. Henderson IR, Czeczulin J, Eslava C, Noriega F, Nataro JP: Characterization of pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1999, 67(11):5587-5596.

50. Savarino SJ, Fasano A, Watson J, Martin BM, Levine MM, Guandalini S, Guerry P: Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, 90(7):3093-3097.

51. Menard LP, Dubreuil JD: Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1): a new toxin with an old twist. *Crit Rev Microbiol* 2002, 28(1):43-60.

52. Klapproth JM, Scaletsky IC, McNamara BP, Lai LC, Malstrom C, James SP, Sonnenberg MS: A large toxin from pathogenic *Escherichia coli* strains that inhibits lymphocyte activation. *Infect Immun* 2000, 68(4):2148-2155.

53. Nicholls L, Grant TH, Robins-Browne RM: Identification of a novel genetic locus that is required for in vitro adhesion of a clinical isolate of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. *Mol Microbiol* 2000, 35(2):275-288.

54. Burland V, Shao Y, Perna NT, Plunkett G, Sofia HJ, Blattner FR: The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Escherichia coli* O157:H7. *Nucleic Acids Res* 1998, 26(18):4196-4204.

55. Latham WW, Grys TE, Witowski SE, Torres AG, Kaper JB, Tarr PI, Welch RA: StcE, a metalloprotease secreted by *Escherichia coli* O157:H7, specifically cleaves C1 esterase inhibitor. *Mol Microbiol* 2002, 277-288(2)45.

- 56.Perna NT, Plunkett G, 3rd, Burland V, Mau B, Glasner JD, Rose DJ, Mayhew GF, Evans PS, Gregor J, Kirkpatrick HA *et al*: Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* 2001, 409(6819):529-533.
- 57.Heimer SR, Welch RA, Perna NT, Posfai G, Evans PS, Kaper JB, Blattner FR, Mobley HL: Urease of enterohemorrhagic *Escherichia coli*: evidence for regulation by fur and a trans-acting factor. *Infect Immun* 2002, 70(2):1027-1031.
- 58.Scaletsky IC, Fabbriotti SH, Carvalho RL, Nunes CR, Maranhao HS, Morais MB, Fagundes-Neto U: Diffusely adherent *Escherichia coli* as a cause of acute diarrhea in young children in Northeast Brazil: a case-control study. *J Clin Microbiol* 2002, 40(2):645-648.
- 59.Bilge SS, Clausen CR, Lau W, Moseley SL: Molecular characterization of a fimbrial adhesin, F1845, mediating diffuse adherence of diarrhea-associated *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *J Bacteriol* 1989, 171(8):4281-4289.
- 60.Hasan RJ, Pawelczyk E, Urvil PT, Venkatarajan MS, Goluszko P, Kur J, Selvarangan R, Nowicki S, Braun WA, Nowicki BJ: Structure-function analysis of decay-accelerating factor: identification of residues important for binding of the *Escherichia coli* Dr adhesin and complement regulation. *Infect Immun* 2002, 70(8):4485-4493.
- 61.Peiffer I, Servin AL, Bernet-Camard MF: Piracy of decay-accelerating factor (CD55) signal transduction by the diffusely adhering strain *Escherichia coli* C1845 promotes cytoskeletal F-actin rearrangements in cultured human intestinal INT407 cells. *Infect Immun* 1998, 66(9):4036-4042.
- 62.Bernet-Camard MF, Coconnier MH, Hudault S, Servin AL: Pathogenicity of the diffusely adhering strain *Escherichia coli* C1845: F1845 adhesin-decay accelerating factor interaction, brush border microvillus injury, and actin disassembly in cultured human intestinal epithelial cells. *Infect Immun* 1996, 64(6):1918-1928.
- 63.Peiffer I, Bernet-Camard MF, Rousset M, Servin AL: Impairments in enzyme activity and biosynthesis of brush border-associated hydrolases in human intestinal

Caco-2/TC7 cells infected by members of the Afa/Dr family of diffusely adhering *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* 2001, 3(5):341-357.

64.Tieng V, Le Bouguenec C, du Merle L, Bertheau P, Desreumaux P, Janin A, Charron D, Toubert A: Binding of *Escherichia coli* adhesin AfaE to CD55 triggers cell-surface expression of the MHC class I-related molecule MICA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, 99(5):2977-2982.

65. Clarke SC, Haigh RD, Freestone PP, Williams PH: Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2003, 16(3):365-378.

66.Scaletsky IC, Pedroso MZ, Fagundes-Neto U: Attaching and effacing enteropathogenic *Escherichia coli* O18ab invades epithelial cells and causes persistent diarrhea. *Infect Immun* 1996, 64(11):4876-4881.

67.McDaniel TK, Jarvis KG, Donnenberg MS, Kaper JB: A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, 92(5):1664-1668.

68.Jerse AE, Yu J, Tall BD, Kaper JB: A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990, 87(20):7839-7843.

69.Kenny B, DeVinney R, Stein M, Reinscheid DJ, Frey EA, Finlay BB: Enteropathogenic *E.coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* 1997, 91(4):511-520.

70.Gad Frankel, Alan D. Phillips, Ilan Rosenshine, Gordon Dougan, Kaper JB, Stuart a, Knutton5: Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* : more subversive elements. *Molecular Microbiology* 1990.921-911:(5)30-8.

71.Muza-Moons MM, Koutsouris A, Hecht G: Disruption of cell polarity by enteropathogenic *Escherichia coli* enables basolateral membrane proteins to migrate apically and to potentiate physiological consequences. *Infect Immun* 2003, 71(12):7069-7078.

- 72.Sinclair JF, O'Brien AD: Cell surface-localized nucleolin is a eukaryotic receptor for the adhesin intimin-gamma of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Biol Chem* 2002, 277(4):2876-2885.
- 73.Campellone KG, Leong JM: Tails of two Tirs: actin pedestal formation by enteropathogenic *E.coli* and enterohemorrhagic *E.coli* O157:H7. *Curr Opin Microbiol* 2003, 6(1):82-90.
- 74.Vallance BA, Finlay BB: Exploitation of host cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97(16):8806-8799.
- 75.Sanger JM, Chang R, Ashton F, Kaper JB, Sanger JW: Novel form of actin-based motility transports bacteria on the surfaces of infected cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 1996, 34(4):279-287.
- 76.Kenny B, Ellis S, Leard AD, Warawa J, Mellor H, Jepson MA: Co-ordinate regulation of distinct host cell signalling pathways by multifunctional enteropathogenic *Escherichia coli* effector molecules. *Mol Microbiol* 2002, 44(4):1095-1107.
- 77.Crane JK, McNamara BP, Donnenberg MS: Role of EspF in host cell death induced by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* 2001, 3(4):197-211.
- 78.Giron JA, Ho AS, Schoolnik GK: An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 1991, 254(5032):710-713.
- 79 Trabulsi LR, Keller R, Tardelli Gomes TA: Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* 2002, 8(5):508-513.
- 80.Hernandes RT, Elias WP, Vieira MA, Gomes TA: An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 2009, 297(2):137-149.
- 81.Kenny B: Mechanism of action of EPEC type III effector molecules. *Int J Med Microbiol* 2002, 291(6-7):469-477.
- 82.Hecht G, Marrero JA, Danilkovich A, Matkowskyj KA, Savkovic SD, Koutsouris A, Benya RV: Pathogenic *Escherichia coli* increase Cl⁻ secretion from intestinal epithelia by upregulating galanin-1 receptor expression. *J Clin Invest* 1999, 104(3):253-262.

- 83.Mellies JL, Navarro-Garcia F, Okeke I, Frederickson J, Nataro JP, Kaper JB: espC pathogenicity island of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes an enterotoxin. *Infect Immun* 2001, 69(1):315-324.
- 84.Garmendia J FG, Crepin VF.: Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation ,translocation, translocation. *Infect Immun* 2005, 73:2573-2585.
- 85.Hernandes RT, WPE, MnAMV, Gomes TnAT: An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 2009:137–149.
- 86.Jores J, Rumer L, Wieler LH: Impact of the locus of enterocyte effacement pathogenicity island on the evolution of pathogenic *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol* 2004, 294(2-3):103-113.
- 87.Chen HD, Frankel G: Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. *FEMS Microbiol Rev* 2005, 29(1):83-98.
- 88.Muller D, Benz I, Liebchen A, Gallitz I, Karch H, Schmidt MA: Comparative analysis of the locus of enterocyte effacement and its flanking regions. *Infect Immun* 2009, 77(8):3501-3513.
- 89.Mellies JL, Elliott SJ, Sperandio V, Donnenberg MS, Kaper JB: The Per regulon of enteropathogenic *Escherichia coli* : identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (Ler). *Mol Microbiol* 1999, 33(2):296-306.
- 90.Elliott SJ, Wainwright LA, McDaniel TK, Jarvis KG, Deng YK, Lai LC, McNamara BP, Donnenberg MS, Kaper JB: The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Mol Microbiol* 1998, 28(1):1-4.
- 91.Deng W, Puente JL, Gruenheid S, Li Y, Vallance BA, Vazquez A, Barba J, Ibarra JA, O'Donnell P, Metalnikov P et al: Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, 101(10):3597-3602.

- 92.Barba J, Bustamante VH, Flores-Valdez MA, Deng W, Finlay BB, Puente JL: A positive regulatory loop controls expression of the locus of enterocyte effacement-encoded regulators Ler and GrlA. *J Bacteriol* 2005, 187(23):7918-7930.
- 93.C. Lara-Ochoa ROaAH-S: Regulation of the LEE-pathogenicity island in attaching and effacing bacteria. *Microbiology & microbial biotechnology* 2010.
- 94.Nougayrede JP, Fernandes PJ, Donnenberg MS: Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells. *Cell Microbiol* 2003, 5(6):359-372.
- 95.Knutton S, Baldwin T, Williams PH, McNeish AS: Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1989, 57(4):1290-1298.
- 96.Garmendia J FG, Crepin VF.: Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* translocation, translocation
. *Infect Immun* 2005, 73:2573-2585
- 97.Celli J, Deng W, Finlay BB: Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) attachment to epithelial cells: exploiting the host cell cytoskeleton from the outside. *Cell Microbiol* 2000, 2(1):1-9.
- 98.H. R. Malish NLF, D. V. Zurawski, P. Chowrashi, J. C. Ayoob, J. W. Sanger, Sanger aJM: Potential role of the EPEC translocated intimin receptor(Tir) in host apoptotic events. *Apoptosis* 2003, 8:179-190.
- 99.Oliver Marche `s, Miranda Batchelor, Robert K. Shaw, Amit Patel, Nicola Cummings, Takeshi Nagai, Chihiro Sasakawa, Sven R. Carlsson, Richard Lundmark, Celine Cougoule et al: EspF of Enteropathogenic *Escherichia coli* Binds Sorting Nexin 9. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* 2006, Vol.188, No.8:3110-3115.
- 100.Ana Arbeloa, Miguel Blanco, Fabiana C. Moreira, Richard Bulgin, Cecilia Lopez, Ghizlane Dahbi, Jesu ´s E. Blanco, Azucena Mora, Mari´a Pilar Alonso, Rosalia Ceferina Mamani *etal*: Distribution of espM and espT among enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Journal of Medical Microbiology* 2009, 58:988–995.

101. Simovitch M, Sason H, Cohen S, Erez Zahavi E, Naomi Melamed-Book, Aryeh Weiss, Aroeti B, and, Rosenshine I: EspM inhibits pedestal formation by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* and enteropathogenic *E. coli* and disrupts the architecture of a polarized epithelial monolayer. *Cellular Microbiology* 2010, 12(40):489–505.
102. Richard R. Bulgin, Ana Arbeloa, Chung JCS, Frankel aG: EspT triggers formation of lamellipodia and membrane ruffles through activation of Rac-1 and Cdc42. *Cellular Microbiology* 2009, 11(2):217–229.
103. Kenny B: Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) a crafty subversive little bug *Microbiology* 2002, 148(Pt 7):1967-1978.
104. Ana Arbeloa, Richard R. Bulgin, Georgina MacKenzie, Robert K. Shaw, Mark J. Pallen, Valerie F. Crepin, Berger CN, Frankel aG: Subversion of actin dynamics by EspM effectors of attaching and effacing bacterial pathogens. *Cellular Microbiology* 2008, 10(7):1429–1441.
105. Xuanlin Tu, , Israel Nisan, Chen Yona, , Hanski E, , Rosenshine aI: EspH, a new cytoskeleton-modulating effector of enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 2003, 47(3):595–606.
106. Kenny PDaB: The effector repertoire of enteropathogenic *E.coli*: ganging up on the host cell. *Current Opinion in Microbiology* 2009, 12:101-109.
107. Jose A. Sanclement MD. Bacterial Biofilms in Surgical Specimens of Patients with Chronic Rhinosinusitis. Article first published online: 3 JAN 2009 DOI: 10.1097/01.mlg.0000161346.30752.18.
108. Hall-Stoodley, L., J. W. Costerton, and P. Stoodley, Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2:95–108, 2004.
109. Merle E. Olson, Howard Ceri, Douglas W. Morck, Andre G. Buret, and Ronald R. Read. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can J Vet Res.* 2002 Apr; 66(2): 86–92.
110. Lewis, K., Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 999-1007, 2001.

- 111.Karatan, E., and P. Watnick, Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev* 73:310–347., 2009.
- 112.Muüller, C.M., et al, Type 1 fimbriae, a colonization factor of uro-pathogenic *Escherichia coli*, are controlled by the metabolic sensor CRP-cAMP. *PLoS Pathog.* 5:e1000303, 2009.
- 113.Elvers, K.T., and H. M. Lappin-Scott, *Biofilms and biofouling* 2nded. vol. 1. Academic Press, San Diego, CA, 2000.
- 114.Barken, K.B., et al, Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environ. Microbiol.* 10:2331–2343, 2008.
- 115.Barraud, N., et al, Nitric oxide-mediated dispersal in single- and multi-species biofilms of clinically and industrially relevant microorganisms. *Microb. Biotechnol.* 2:370–378, 2009.
- 116.Kucharska, D.W.A.Z., Medicinal plants extracts affect virulence factors expression and biofilm formation by the uropathogenic *Escherichia coli*. *Urol Res* (2012) 40:683–697, 2012.
117. Li Chen, Y.-m.W., The role of bacterial biofilm in persistent infections and control strategies *Int J Oral Sci* (2011) 3: 66-73, 2011.
118. N Hoiby, C Moser, J William Costerton. Towards diagnostic guidelines for biofilm-associated infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* 65 (2012) 127–145.
- 119.Hyde JA, D.R., Costerton JW, Strategies for prophylaxis against prosthetic valve endocarditis: a review article. *J Heart Valve Dis* 1998; 7: 313–15, 1998.
- 120.Gristina AG, S.Y., Giridhar G, Kreger A, Myrvik QN, The glycocalyx, biofilm, microbes, and resistant infection. *Semin Arthroplasty* 1994; 5: 160–70, 1994.
- 121.Ming-xi Hu, X.Z., Er-li Li Recent Advancements in Toxin and Antitoxin Systems Involved in Bacterial Programmed Cell Death.Hindawi Publishing Corporation International Journal of Microbiology Volume 2010, Article ID 781430, 10 pages doi:10.1155/2010/7814302010.

122. Julia J. Williams , P.J.H., Exposing Plasmids as the Achilles' Heel of Drug-Resistant Bacteria. . Published in final edited form as: Curr Opin Chem Biol. 2008 August ; 12(4): 389-399. doi:10.1016/j.cbpa.2008.06.0152008.
123. Virginie Tsilibaris, G.v.M.-M., Natacha Mine, What Is the Benefit to *Escherichia coli* of Having Multiple Toxin-Antitoxin Systems in Its Genome? Journal Of Bacteriology, Sept. 2007, p. 6101-6108, 2007.
124. Boaz Sat, R.H., Tova Fisher, Hanita Khaner Programmed Cell Death in *Escherichia coli*: Some Antibiotics Can Trigger mazEF Lethality. Journal Of Bacteriology, 0021-9193/01/\$04.0010 DOI: 10.1128/JB.183.6.2041-2045.2001Mar. 2001, p. 2041-2045, 2001.
125. Hanna Engelberg-Kulka, Boaz Sat, Myriam Reches Bacterial programmed cell death systems as targets for antibiotics. Department of Molecular Biology, The Hebrew University-Hadassah Medical School, 2004.
126. Hanna Engelberg-Kulka, R.H., mazEF: a chromosomal toxin-antitoxin module that triggers programmed cell death in bacteria. 1) Journal of Cell Science 118, 4327-4332 Published by The Company of Biologists 2005 doi:10.1242/jcs.026192005.
127. Ilana Kolodkin-Gal., R.V., A Differential Effect of *E. coli* Toxin-Antitoxin Systems on Cell Death in Liquid Media and Biofilm Formation. PLoS One 4(8): e6785. doi:10.1371/journal .pone.00067852009.
128. Harrison, J.J., H. Ceri, and R. J. Turner, Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms. Nat. Rev. Microbiol. 5:928–938, 2007.
129. Balaban, N.Q., J. Merrin, R. Chait, L. Kowalik, and S. Leibler, Bacterial persistence as a phenotypic switch. Science 305:1622–1625, 2004 .
130. Moyed, H.S., and K. P. Bertrand, hipA, a newly recognized gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. J. Bacteriol. 155:768–775, 1983.
131. Harrison, J.J., H. Ceri, N. J. Roper, E. A. Badry, K. M. Sproule, and R. J. Turner and Persister cells mediate tolerance to metal oxyanions in *Escherichia coli*. Microbiology 151:3181-95, 2005.
132. Klapper, I., P. Gilbert, B. P. Ayati, J. Dockery, and P. S. Stewart, Senescence can explain microbial persistence. Microbiology 153:3623–3630, 2007.

133. Black, D.S., A. J. Kelly, M. J. Mardis, and H. S. Moyed, Structure and organization of *hip*, an operon that affects lethality due to inhibition of peptidoglycan or DNA synthesis. *J. Bacteriol.* 173:5732–5739, 1991.
134. Keren, I., D. Shah, A. Spoering, N. Kaldalu, and K. Lewis, Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 186:8172–8180, 2004.
135. Hudault S, Guignot J, Servin AL: *Escherichia coli* strains colonising the gastrointestinal tract protect germfree mice against *Salmonella typhimurium* infection. *Gut* 2001, 49(1):47-55.
136. AL-Jasser, A., Extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs): A global problem, *Jour. Kuwait Medical.* 2006, Vol. 38, No. 3, PP. 171-185.
137. Bradford, P.A., Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat, *Jour. Clinical Microbiology Reviews.* 2001, Vol. 14, No. 4, PP 933-951.
138. Joklik, W.K, Willett, H.S., Wilfert, C.H (eds)., *Antimicrobial agents*. In: *Zinsser Microbiology*, chapter 9, 20th ed. Pub. Norwalk, Appleton and Lange. 2005, PP. 153-187.
139. Abraham EP, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. *Rev Infect Dis.* 1988 Jul-Aug;10(4):677-8.
140. Medeiros AA. Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. *Clin Infect Dis.* 1997 Jan;24 Suppl 1:S19-45.
141. Levinson, W, 2010, *Review of medical microbiology and immunology*. 11th ed. New York: Lange, pp. 85-93.
142. Miller MT, Bachmann BO, Townsend CA, Rosenzweig AC. Structure of beta-lactam synthetase reveals how to synthesize antibiotics instead of asparagine. *Nat Struct Biol.* 2001 Aug;8(8):684-9.

143. Wolter DJ, Lister PD. Mechanisms of β -lactam resistance among *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr Pharm Des.* 2013;19(2):209-22.
144. Majiduddin FK, Materon IC, Palzkill TG. Molecular analysis of beta-lactamase structure and function. *Int J Med Microbiol.* 2002;292(2):127-37.
145. Babic M, Hujer AM, Bonomo RA. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. *Drug Resist Updat.* 2006;9(3):142-56.
146. Zapun A, Contreras-Martel C, Vernet T. Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 2008;32(2):361-85.
147. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-Third informational supplement. Vol:33,M100-S23. Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, 2013.
148. Palucha, A., Mikiewicz, B., Hryniewicz, W., Griadkowski, M. Concurrent outbreaks of extended-spectrum beta-lactamase-producing organism of the family *Enterobacteriaceae* in a Warsaw hospital, *Jour. Antimicrob Chemother.*, 1999 ;vol, 44, PP. 489-499.
149. Mocktar, C., Govinden, U., Sturm, A.W., Essack, S. TEM-146 beta-lactamases produced by *Escherichia coli* isolates from state hospitals KwaZulu-Natal, South Africa, *Jour. African Journal Of Biotechnology.*, 2007; vol, 6, No. 5, PP. 493-495.
150. Livermore DM, Woodford N. The beta-lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends Microbiol.* 2006;14(9):413-20.
151. Thomson, K. Controversies about extended - spectrum and AmpC beta-lactamases, *Jour. Emerg Infect Dis.*, 2006; 7(2): 1-9 .
152. Song, J.S., Lee, J.H., Lee, J.H., Jeong, B.C., Lee, W.K., Lee, S. H Removal of contaminating TEM-1a beta-lactamase gene from commercial Taq DNA polymerase. *Jour. Microbiology.* 2006, ;Vol. 44, PP. 126-128.

153. Jain A, Mondal R. Prevalence & antimicrobial resistance pattern of extended spectrum betalactamase producing *Klebsiella spp* isolated from cases of neonatal septicaemia. Indian J Med Res 2007; 125 : 89-94.
154. Nazik H OB, Erdogan Yildirim E , Ermi F. High prevalence of CTX-M-type beta-lactamase in *Escherichia coli* isolates producing extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and displaying antibiotic co-resistance. African Journal of Microbiology Research. 2011;5(1):44-9.
155. Bratu S, Brooks S, Burney S, Kochar S, Gupta J, Landman D, Quale J. Detection and spread of *Escherichia coli* possessing the plasmid-borne carbapenemase KPC-2 in Brooklyn, New York. Clin Infect Dis. 2007; 44(7):972-5.
156. Chong Y, Ito Y, Kamimura T. Genetic evolution and clinical impact in extended-spectrum b-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. Infect Genet E. 2011;10 (16):11-13
157. Talbot G. H, J Bradley J, E Edwards, Jr D. Gilbert M. Scheld, and J. G. Bartlett. Bad bugs need drugs: an update on the development pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America. Clin. Infect. Dis. 2006; 42:657–668.
158. Philippon, A. Arlet, G., Jacoby, G.A. Plasmid-determined Amp^r: type beta-lactamases, Jour. Antimicrob Agents Chemother. 2002; Vol. 46, PP. 1-11.
159. Liu, G., Ling, B.D., Zeng, Y., Lin, L., Xie, Y.E., Lei, J. Molecular Characterization of Extended-spectrum beta-lactamases produced by clinical of *Enterobacter cloacae* from a teaching hospital in China. Jour. Infection disease. 2007; 61(2) : 286-289.
160. Nukaga, M., Kumar, S., Nukaga, K., Pratt, R.F., Knox, J.R. Hydrolysis of third-generation cephalosporins by class C-Lactamases. Jour. biochemistry., 2004; 279(10): 9344-9352.

161. Chmelnitsky, I., Carmeli, Y., Leavitt, A., Schwaber, M. J, Navon – Venezia, S. CTX-M-2 and a new CTX – M - 39 enzyme are the major extended-spectrum B- lactamases in multiple *Escherichia coli* clones isolated in Tel Aviv, Israel , Jour. Antimicrob Agents Chemother.2005 ;49 (11): 4745- 50.
162. Varaiya, A., Dogra, J., Kulkarni, M., Bhalekar, P. Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in diabetic foot infection, Jour. Indian Medical Microbiology.2008; 26(3):281-282.
163. Blondean, J.M. Extended - spectrum p-lactamases, Jour. Semin Resoir Infectal.2001; 16: 169-179.
- 164.Clark NM,Patterson J,Lynch JP3rd. Antimicrobial resistance among, gram-negative organisms in the intensive care unit. Curr Opin Crit Care.2003;9(5):413-23.
- 165.Li XZ,Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. Drugs. 2004;64(2):159-204.
166. Shafer WM, Folster JP. Towards an understanding of chromosomally mediated penicillin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: evidence for a porin-efflux pump collaboration. J Bacteriol. 2006;188(7):2297-9.
167. Livermore DM. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. Clin Infect Dis. 2003; 15;36(Suppl 1):S11-23.
- 168.Normark H.B, Normark S. Evolution and spread of antibiotic resistance. J Int Med 2002;252:91-106.
- 169.Acar JF, Moulin G. Antimicrobial resistance: a complex issue. Rev Sci Tech.2012;31(1):23-31.
170. Cantón R, Morosini MI, de la Maza OM, de la Pedrosa EG. IRT and CMT beta-lactamases and inhibitor resistance. Clinical Microbiology and Infection.2008;14 Suppl 1:53-62.

171. Yusha MM, Kumurya AS, Suleim n L. Prev lence of extended spectrum β -lactamases (ESBLs) among *enterobacteriaceae* in murtala mohammed specialist hospital, Kano, Nigeria.Bajopas.2010;3(1):169-172.
172. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54(3):969-76.
173. Bonomo, R.A., Rice L.S. Inhibitor resistant class A beta-lactamses, Jour. Frontiers in Bioscience1999., Vol. 4:34-41.
174. Ambrose, P.G., Owans, R.C., Quintiliani, R. Antibiotic use in the critical care unit, Jour. CrU Care Clin.1998; 14(3): 283-308
175. Sturenburg, E., Mak, D. Extended-spectrum beta- lactamases: Implications for the clinical microbiology Laboratory, therapy, and infection control of infection, Jour. Infection.2003; Vol. 47: 273-295.
176. Koseoglu, O., Kocaguz, S., Gur, D., Akova, M., 2001, Nosocomial blood stram infection in Turkish university hospital : Study of Gram-negative bacilli and their sensitivity patterns, Jour. International of Antimicrobial Agents., Vol. 17, No. 1, PP. 477-481.
177. Barnaud, G., Arlet, G., Verdet, C., Gaillot, O., Lagrange, P.H., Philippon, A., *Salmonella enteritidis*: AmpC plasmid-mediated inducible beta-lactamses(DHD-I) with an amp R gene from *Morganella morganii*. Antimicrob, Jour. Agents Chemother. 1998, Vol. 42, PP. 2352-8.
178. Barroso, H., Freitas –vieira, A., Lito, L.M., Cristino, M.L., Salgado, M.L., Neto, H.F., Sousa, J.C., Soveral, G., Duarte, A., Survey of *Klebsiella pneumoniae* producing extendedspectrum beta-lactamsesat a Portuguese hospital :TEM-10 as the endemic enzyme, Jour. Antimicrob Chemother. 2000, Vol. 45, PP. 611-616.

179. Barthelemy, M., Peduzzi, L., Labia R. Distinction entre les structures primaires des beta- lactamases TEM-1 et TEM-2, Ann. Inst, Jour. Pasteur Microbial. 1985. Vol. 136: 311-321.
180. Bauernfeind, A., Grimm, H., Schweighart, S., A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*, Jour. Infection. 1999, Vol. 18, No. 1, PP.294-8.
181. Vahaboglu, H., Ozturk, R., Aygun, G., Coskunkan, F., Yaman, A., Kaygusuz, A., Leblebicioglu, H., Balik, I., Aydin, K., Otkun, M., Widespread detection of PER-1 type extended-spectrum beta-lactamses among nosocomial *Acintobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: A nationwide multicentre study, Jour. Antimicrob Agents Chemother. 1997, Vol. 41, PP. 2265-2269.
182. Feria, C.P., Canica, M., A novel sequence framework (bla_{TEM-1G}) encoding the paternal TEM-1 beta-lactamase. Jour. FEMS Microbiology Letters. 2003, Vol. 220, PP. 177-180.
183. Baran, L.R., Muckatira, B., Khatib, R, Candidemia before and during the fluconazole era: prevalence, type of species and approach to treatment in a tertiary care community hospital Scand, Jour. Infect Dis., 2001, Vol. 33 No. 2, PP. 137-139.
184. Karim, A., Poirel, L., Nagarajan, S., Nordmann, P., Plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamses (CTX-M-3 like) from India and gene association with insertion sequence IsFcp1, Jour. FEMS Microbiol. Lett. 2001, Vol. 201, PP.237-241.
185. Humeniuk, C., Arlet, G., Gautier, V., Grimont, D., Labia, R., Phillippon, A., Beta-lactamase of *Kluyvera ascorbota*, probable progenitors of some plasmid encoded CTX-M-types beta –lactamases, Jour. Antimicrob Agents Chemother. 2002, Vol. 46, PP. 3045-3049.
186. Sabate, M., Tarrago, R, Navarro, F., Miro, E., verges, C., Barbe, J., Prats, G., Cloning and sequence of the gene encoding a novel cefotaxime-hydrolyzing beta-

lactamses (CTX-M-9) from *Escherichia coli* in Spain. Antimicrob, Jour. Agents Chemother. 2002, Vol. 44, PP. 1970-1973.

187. Pai, H., Lee, H.J., Choi, E.H., Kim, J., Jacoby, G.A., Evolution of TEM-related extended-spectrum beta-lactamases in Korea, Jour. Anti microb Agent Chemother. 2001, Vol. 45, PP. 3651-3653.

188. Liu, G., Ling, B.D., Zeng, Y., Lin, L., Xie, Y.E., Lei, J., Characterization of CTX-22 and TEM-141 encoded by clinical isolates of *Enterobacte cloacae* in China, Jour. Infect Dis. 2007, Vol. 60, PP. 295-297.

189. Kliebe, CB., Nies, A., Meyer, S.F., Tolxdorff-Neutzling, R.M., Wiedeman, B., Evolution of plasmid-coded resistance to board-spectrum cephalosporin. Antimicrob, Jour. Agents Chemother. 1985, Vol. 28, PP. 302-307.

190. Philippon, L.N., Naas, T., Bouthors, A.T., Barakett, V., Nordmann, P., Oxa-18, a class D clavulanic acid-inhibitors extended-spectrum beta-lactamses from *Pseudomonas aeruginosa*. Jour. Antimicrob Agents Chemother. 1997,; Vol. 47, No. 1, PP. 2188-2195.

191. Arlet, G., Bami, G., Decere, D., Flippo, A., Galtolot, O., Lagrange, P.H., Philippon, A., Molecular characterization by PCR-restriction fragment length polymorphism of TEM beta-lactamse, Jour. FEMS Microbiol Lett; 1995, Vol. 134, PP. 1498-1500.

192. Lahey Clinic. Amino acid sequences for TEM, SHV and OXA extended-spectrum and inhibitor resistant beta-lactamases. Availble from <http://www.lahey.org/Studies/George.A.Jacoby@lahey.org>. Last modified 2008.

193. Sougakoff, W.,Goussard, S.,Courvalin, P., TEM-3 beta-lactamases, which hydrolyzes broad- spectrum cephalosporins, is derived from the TEM-2 penicillinase by two amino acid substitutions, Jour. FEMS Microbial Lett. 1988, Vol. 56, No,1, PP. 343-348.

194. Rodrieguez, B.J., Navarro, M.D., Romero, L., Martinez, L., Epidemiology and clinical ifections ESB�- producing *Klebsiella* strain, Jour. Antimicrobial chemotherapy. 2006, Vol. 57, PP. 562-565.
195. Shamim, M., Mumtaz, A., Irum, A., Naeem, A., Abdul, H., 2008, Frequency of extended-spectrum beta-lacamse (ESBL) and Blood Stream Infections, Jour. Infection journal of Pakestan., Vol. 17, No. 2, PP. 48-51.
196. Mathani, D., Rhomberg, P.R., Biedenbach, R.N., Evaluation of the invitro activity of six broad- spectrom beta-lactam antimicrobial agents tasteagainst recentclinical isolates from India: a survey often mrdical center laboratories, Jour. Diagn Microbial Infect Dis. 2002, Vol. 44, No. 1, PP. 367-377.
197. Jeong, S.H., Bae, I.K., Lee, J.H., Sohn, S.G., Jeon, G.J., Kim, Y. H., Jeong, B. C., Lee, S. H., Spectrum beta-Lactamases Produced by Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Esherichi coli* from a Korean Nationwide Survey, Jour. Clinical Microbiol. 2004, Vol. 42, No. 7, PP. 2902-6.
198. Moubareck, C., Daoud, Z., Hakime, N.I., Hamze, M., Mangeney, N., Countrywide Spread of Community and Hospital Acquired Extended-Spectrum beta- Lactamases (CTX – M – 15) Producing *Enterobacteriaceae* in Lebanon, Jour. Clinical Microbial . 2005, Vol. 43, No 7, PP. 3309 – 13.
199. Kader, A.A., Kumar, A., Prevalence and antimicrobial susceptibility of extended-spectrum beta- lactamase (CTX-M-15) producing Enscherichia coli and Klebsiella pneumoniae in a genral hospital, Jour. Ann Saudi Med, 2005, Vol. 25, No. 3, PP. 239-42.
200. Yu, Y., Ji, S.,Chen, Y Resistance of strains producing extended-spectrum B-lactamases and genotype distribution in China,Jour. Infect.2007,Vol.54,PP. 53-57.

201. Hawkey, P.M. Prevalence and clonality of extended-spectrum beta-lactamase in Asia, Jour. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2008 Vol. 14, PP. 159-165.
202. Goyal, A., Prasad, A., Ghoshal, U., Prasad, K.N., Comparison of disk diffusion, disk potentiation and double disk synergy methods for detection of extended spectrum beta lactamases in *Enterobacteriaceae*, Jour. Indian Med Res. 2008, Vol. 128, PP. 209-211.
203. Zamberi, S., Rusmah, Y., Rusmah, M., Extended-spectrum beta-lactamases-producing *E. coli* from a tertiary hospital in Malaysia: emergence of CTX-M-type beta-lactamases variation, Jour. Research of Microbiology. 2008, PP. 1-5.
204. Shah, P.T., Hassan, F., Ahmad, S., Hameed, A., Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of Gram-negative bacilli producing ESBLs, Jour. Research in Microbiology. 2004, Vol. 25, PP. 17-25.
205. Cormican, M.G., Marshall, S.A., Jones, R.N., Detection of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL)-producing strains by the E-test ESBL screen, Jour. Clin Microbiol. 1996, Vol. 34, PP. 1880-1884.
206. Jacoby, G.A., Munoz-Ponce, L.S., Mechanism of disease the new beta-lactamases, The "New England Journal of Medicine". 2005, Vol. 352, PP. 80-91.
207. Quellette, M., Paul, G.C., Philpott, A.M., Roy, P.H., Oligonucleotide probes (TEM-1, OXA-1) versus isoelectric focusing in beta-lactamase characterization of 114 resistant strains, Jour. Antimicrob Agents Chemother., 1988, Vol. 32, PP. 397-399.
208. Navon-Venezia, S., Hammer-Munz, O., Schwartz, D., Turner, D., Kuzmenko, B. Carmeli y. Occurrence and phenotypic characteristics of extended-spectrum beta-lactamases among members of the family Enterobacteriaceae at the Tel-Aviv Medical Center and evaluation of diagnostic tests, Jour. Clin Microbiol. 2003, Vol. 41, PP. 155-8.

209. Mabilat, C., Courvalin, P., Development of "oligotyping" for characterization and molecular epidemiology of TEM beta-lactamase in members of the family *Enterobacteriaceae*, Jour. Antimicrob Agents Chemother. 1990,, Vol. 34, No. 1, PP. 2210-2216.
210. Jureen, R., Koh, T.H., Wang, G., Chai, L., Tan, A.L., Chai, T., Wong, Y.W., , Use of multiple methods for genotyping fusarium during an outbreak of contact lens associated fungal keratitis in Singapore,Jour. BMC infectious Diseases2008.,PP.1-6.
211. Rademaker, J.L.W., Debruijn, F.J. Charactrization and classification of microbes by Rep-PCR genomic fingerprinting and computer-assisted pattern analysis, Jour. International Congress of Molecular Plant-Microbe Interactions APS press., 1996, PP. 497-502.
212. Kotra L, Mobashery S. Beta-lactamases and resistance to beta-lactam antibiotics. Bulletin de l'Institut Pasteur. 1998;96(3):139-150.
213. Rubio-Perez I, Martin-Perez E, Domingo Garcia D, Lopez-Brea Calvo M , Larran~aga Barrera E. Extended-spectrum beta-lactamaseproducing bacteria in a tertiary care hospital in Madrid: epidemiology, risk factors and antimicrobial susceptibility patterns. Emerg Health Threats J 2012, 5: 11589 .
214. Mobaiyen H,Nahai M,Parnoor Mobasher A,Sadeghi J. Frequency of TEM, CTX-M and SHV Genes of *Escherichia coli* in Tabriz Hospitalized Patients in ICU .Microbilogi since 2009; 1(2):33-39 .
215. Meybeck A, Ricard JD, Barnaud G, Eveillard M, Chevrel G, ounier R ,Dreyfuss D. Incidence and impact on clinical outcome of infections with piperacillin/tazobactam resistant *Escherichia coli* in ICU: A retrospective study BMC Infectious Diseases 2008, 8:67(doi:10.1186/1471-2334-8-67).

216. Chaiwarith R, et al. Surveillance of Antimicrobial Resistance among Bacterial Pathogens Isolated from Hospitalized Patients at Chiang Mai University Hospital, 2006-2009. J INFECT DIS ANTIMICROB AGENTS. Jan.-April 2011; Vol. 28 No. 1.
217. Yang Hsu L , Yen Tan T JureenR , Hsien Koh T , et al., Antimicrobial Drug Resistance in Singapore Hospitals . Emerging Infectious Diseases. December 2007, Vol. 13, No. 12.
218. Martinez P, Garzón D, Mattar S. CTX-M-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from community-acquired urinary tract infections in Valledupar, Colombia. J Infect Dis 2012;16(5):420–425.
219. Shahcheraghi F, Nasiri S, Noveiri H. The survey of genes encoding beta-lactamases, in *Escherichia Coli* resistant to betalactam and non-beta-lactam antibiotics. Iranian J Basic Med Sci 2010;13(1):230-237.
220. Kalantar D, Mansouri Sh. Emergence of multiple β -lactamases produced by *Escherichia coli* clinical isolates from hospitalized patient in Kerman, Iran. Jundishapur J Microbiol 2010;3(4):137-145.
221. Sharma.S, Gupta .A, A. Arora. Cefepime Tazobactam: A new β lactam/ β lactamase inhibitor combination against ESBL producing gram negative bacilli. India, Int J Pharm Biomed Sci 2012, 3(2), 35-38 .
222. Hernández JR, Martínez-Martínez L, Cantón R, Coque TM, Pascual A; Spanish Group for Nosocomial Infections (GEIH). Nationwide study of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain. Antimicrob Agents Chemother. 2005 May;49(5):2122-5.
223. S.M. Rudresh and T. Nagarathnamma: Extended spectrum β -lactamase producing *Enterobacteriaceae* & antibiotic co-resistance. Indian J Med Res. 2011 January; 133(1): 116–118.

224. Meyer et al., Dramatic increase of third-generation cephalosporin-resistant *E. coli* in German intensive care units: secular trends in antibiotic drug use and bacterial resistance, 2001 to 2008 Critical Care 2010, 14:R113(doi: 10.1186/cc9062).
225. Tashkori M, Farokhnia M, Zia Sheikholeslami N, Mirzaei T, Yosefi H, Mokhtari F et al . Evaluation of Producing Extended Spectrum β -lactamase among Isolated *Escherichia Coli* from Patients Suffering from Urinary Tract Infections: (Short Report). Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences. 2011;10(1) :62-68.
226. Mohajeri P, Izadi B, Rezai M, Falahi B, Khademi H, Ebrahimi R. Assessment of the frequency of Extended Spectrum Beta Lactamases Producing *Escherichia coli* Isolated from Urinary Tract Infections and its Antibiotic Resistance Pattern in Kermanshah. J Ardabil Univ Med Sci. 2011; 11(1): 86-94.
227. Mohammadi-Mehr M, Feizabadi MM. Antimicrobial resistance pattern of Gram-negative bacilli isolated from patients at ICUs of Army hospitals in Iran. Iranian Journal Of Microbiology 2011 March ;61(1) :26-30 .
228. Behrooz A , Rahbar M , V\udy on prevalence of Extended-Spectrum β -lactamase (ESBLs) producing *Klebsiella pneumonia* and *Escherichia coli* isolated from urinary specimens in Milad Hospital. Iranian Journal of Medical Microbiology, 2010;4(1):27-34.
229. Soltan Dallal MM, Mobasser G , Fallah Mehrabadi J, Eshraghian MR, Rastegar Lari A, Molla Aghamirzaei H, et al. Detection of CTX-M-1 beta lactamase gene in *Escherichia coli* isolated from clinical samples by Polymerase Chain Reaction (PCR). Tehran University Medical Journal; Vol. 69, No. 1, April 2011: 16-21.
230. Yazdi M, Nazemi A, Mir inargasi M, Khataminejad M, Sharifi S, Babai kochkaksaraei M. Prevalence of SHV/CTX-M/TEM (ESBL) Beta-lactamase

Resistance Genes in *Escherichia Coli* Isolated from Urinary Tract Infections in Tehran, Iran. *mljgoums*. 2010; 4 (1) :48-54.

231. Panahi Y, Mojtahed Zadeh M, Beiraghdar F, Safarnejad S. Antimicrobial resistance pattern Isolated from Urinary Tract Infections Intensive Care Units. *Kowsar Medical Journal*. 2010; 13(3):229-238.

232. Razazi K, Derde LP, Verachten M, Legrand P, Lesprit P, Brun-Buisson C. Clinical impact and risk factors for colonization with extended-spectrum β -lactamase-producing bacteria in the intensive care unit. *Intensive Care Med*. 2012 Nov; 38(11):1769-78.

233. Harris AD, McGregor JC, Johnson JA, Strauss SM, Moore AC, Standiford HC, Hebden JN, Morris JG Jr. Risk factors for colonization with extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria and intensive care unit admission. *Emerg Infect Dis*. 2007 Aug; 13(8):1144-9.

234. Thomson KS. Extended-spectrum-beta-lactamase, AmpC, and Carbapenemase issues. *Journal of clinical microbiology*. 2010 Apr; 48(4):1019-25. PubMed PMID: 20181902. Pubmed Central PMCID: 2849556.

235. Nevine S, El-Damarawy M.M., El-Damarawy F, *CTX-M-15* extended-spectrum beta-lactamases detected from intensive care unit of an Egyptian medical research institute, *Jour. Research of Medical Sciences*. 2008, Vol. 3, (1): 84-91.

236-Copur Cicek A, Saral A, Ozad Duzgun A, Yasar E, Cizmeci Z, Ozlem Balci P, et al. Nationwide study of *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases TEM, SHV and CTX-M in Turkey. *J Antibiot (Tokyo)*. 2013 Nov; 66(11):647-50. PubMed PMID: 23838745.

237. Baudry PJ, Nichol K, DeCorby M, Mataseje L, Mulvey MR, Hoban DJ, et al. Comparison of antimicrobial resistance profiles among extended-spectrum-beta-lactamase-producing and acquired AmpC beta-lactamase-producing *Escherichia*

coli isolates from Canadian intensive care units. Antimicrob Agents Chemother. 2008 May;52(5):1846-9. PubMed PMID: 18299417. Pubmed Central PMCID: 2346658.

238. Peter-Getzlaff S, Polsfuss S, Poledica M, Hombach M, Giger J, Bottger EC, et al. Detection of AmpC beta-lactamase in *Escherichia coli*: comparison of three phenotypic confirmation assays and genetic analysis. Journal of clinical microbiology. 2011 Aug;49(8):2924-32. PubMed PMID: 21653764. Pubmed Central PMCID: 3147754.

ضمیمه

۱. ضمیمه

تهیه نیم مک فارلند: استاندارد نیم مک فارلند سولفات باریوم به روش زیر تهیه می شود :

(۱) ۵/۰ میلی لیتر از کلرورباریوم (BACL) ۰/۰۴۸ mol/l ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ۱/۱۷۵ W/V (%) را به ۹۹/۵ میلی لیتر اسید سولفوریک ۰/۱۸ mol/l (V/V 1%) اضافه کنید و با هم زدن مداوم سوسپانسیون بدست آورید.

(۲) چگالی صحیح کدورت استاندارد با استفاده از اندازه گیری جذب در اسپکتروفتومتر با طول مسیر نوری ۱ سانتی متر، مشخص شود. جذب در ۶۲۵ نانومتر باید بین ۰/۰۸ تا ۰/۱۳ باشد.

(۳) سوسپانسیون سولفات باریوم باید به مقدار ۴-۶ ml در لوله های در پیچ دار هم اندازه با لوله های سوسپانسیون باکتریایی ریخته شود.

(۴) درب این لوله ها باید محکم بسته شوند و در دمای اتاق و در تاریکی نگهداری گردند.

(۵) استاندارد سولفات باریوم قبل از هر بار استفاده باید به شدت (ترجیحا با ورتکس مکانیکی) همزده شود، تا کدورت یکنواختی ایجاد گردد. در صورت مشاهده ذرات بزرگ، باید استاندارد تازه ای تهیه گردد.

(۶) استاندارد سولفات باریوم باید به صورت ماهانه جایگزین شود یا جذب آن اندازه گیری گردد.

سوسپانسیون باکتری معادل نیم مک فارلند حاوی $10^4 \times 1/5$ cfu است.

۲. ضمیمه

اتانل ۷۰٪

از اتانل مطلق ۷۰ سی سی برداشته حجم آن را به ۱۰۰ می رسانیم.

۳. ضمیمه

تهیه بافر TBE 10X

۵۴ گرم تریس را با ۲۷/۵ گرم بوریک اسی د در ۶۰۰ ملی لیتر آب مقطر استریل حل کرده سپس ۲۰ میلی لیتر EDTA (۰/۵ مولار) به آن اضافه کرده و حجم را به یک لیتر می رسانیم.

۴. ضمیمه

EDTA

(۰/۵ مولار): ۱۸/۱۶ گرم EDTA در ۱۰۰ میلی لیتر آب دیونیزه حل کرده و PH را با استفاده از NAOH به ۸ رسانده و سپس توسط اتوکلاو استریل می گردد.

۵. ضمیمه

تهیه بافر TBE 1X

1X TBE از بافر 10X به نسبت ۱ به ۱۰ رقیق کرده و از آن در تانک الکتروفورز و تهیه ژل استفاده می کنیم.

Abstract:

Background and Aim: Infection is a major cause of morbidity and mortality in intensive care units (ICU) worldwide. The occurrence of Extended Spectrum β -lactamase (ESBLs) producing *Escherichia coli* (*E.coli*) has been steadily increased in recent years. The prevalence of ESBL genotypes remain unknown in many region of Iran. The aim of this study were to evaluate the frequency of *bla*_{CTX-M-I}, *bla*_{TEM} and *bla*_{SHV} genes as a most common genotypes among ESBL producing uropathogen *E. coli* isolated from ICU and susceptibility to tested antibiotics.

Methods: A total of two hundred ten uropathogen *E. coli* isolates were collected from patients admitted in ICUs of Qazvin, Karaj and Tehran hospitals during one year period. All isolates were screened for ESBL production by Agar Diffusion according to the CLSI guideline. ESBL phenotypic confirmatory was performed by the clavulanic acid combined disc on Mueller Hinton Agar (MHA) by with and without cloxacillin. PCR and sequencing were conducted for detection of ESBL encoding genes.

Results: Out of 210 *E.coli* isolates, 161(76.7%) isolates were confirmed as ESBL producer, 2.5% of ESBL producing isolates were confirmed only on MHA with cloxacillin. *bla*_{CTX-M-I} (53.4%) [*bla*_{CTX-M-15} (96.5%) and *bla*_{CTX-M-12} (3.5%) as the first report of Iran] was the most common genotype, and followed by *bla*_{TEM-1} (16.8%) gene. Ten percent of isolates contained both *bla*_{CTX-M-I} and *bla*_{TEM-1} genes. *bla*_{SHV} not detected in any isolates. All ESBL producer isolates were high resistant to cephalosporins and monobactams (65.2- 100%) and 68.3% and 28% of ESBL producer isolates resistant to imipenem and ceftazidime respectively. **Conclusion:** The present study shows high rate of ESBL and resistance to common use antibiotics among ICU uropathogen *E. coli*.

Key words: *E.coli*, Uropathogen, Extend Spectrum β -lactamase (ESBLs), ICU



Qazvin University of Medical Sciences

Faculty of Medicine

Department of Microbiology and Immunology

A thesis Submitted for "M.Sc" degree:

Subject:

**Frequency of *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{TEM} and *bla*_{SHV} Genes in Extended
Spectrum Beta Lactamases (ESBLs)-Producing Uropathogen
Escherichia coli Of Intensive Care Unites (ICU) of Qazvin, Tehran
and Karaj Hospitals**

Thesis Advisor:

Dr .Masumeh Aslani Mehr, ph.D.

Dr. Amir Peimani, Ph.D.

Dr.Amir Javad, Ph.D

By: Maryam Mohammad beigi

May .2015



به نلم خطا

صور تجلسمه دفاع لڑ پلان نلمه
فرم مشلره (۲)

معاون عترم پژومشی دانشکده پزشکی:

مهرم مهری

با سلام،

بدینوسیله به استحضار می رساند بایان نامه دانشجویی / تخصصی با عنوان فرایند های
دانشگاه تهران در سال ۱۳۹۴ در رشته پزشکی و در دانشگاه تهران به نام مهرم مهری
متعلق به خانم / آقای مهرم مهری به راهنمایی سرکار خانم / جناب
آقای دکتر مهرم مهری در تاریخ ۹۴/۱۲/۱۹ دفاع گردید و با نمره ۱۹
معادل نور مورد قبول هیئت داوران نامبرده در ذیل قرار گرفت.

مهر و امضاء هیئت داوران:

۱- دکتر مهرم مهری
۲- دکتر مهرم مهری

مهر و امضاء استاد / اماتید
راحتنا:

مهر و امضاء استاد / اماتید
مشاور:

۱- دکتر مهرم مهری
۲- دکتر مهرم مهری
۳- دکتر مهرم مهری

مهر و امضاء اماتید داور:

۱- دکتر مهرم مهری (داور) / دکتر مهرم مهری (داور)
۲- دکتر مهرم مهری (داور) / دکتر مهرم مهری (داور)
۳- دکتر مهرم مهری (داور) / دکتر مهرم مهری (داور)

مهر و امضاء
معاون پژومشی گروه / نماینده ایشان (ناظر)

دکتر مهرم مهری
مدیر گروه

* یادآوری :

مطابق آیین نامه، جلسه دفاعیه ملکامی اعتبار دارد که حداقل نعلم بملره به امضاء هیئت داوران در
جلسه حضور داشته باشند (حضور اماتید و مشاور و معاون پژومشی گروه / ناظر در جلسه دفاع
الزامی است).
نمره اعلام شده، معدل نمرات در جلسه دفاعیه است [اماتید و مشاور، اماتید مشاور، داوران و
معاون پژومشی گروه / نماینده ایشان (ناظر)] که توسط معاون پژومشی گروه / نماینده ایشان (ناظر)
جمع بند و به دانشکده اعلام می شود.